

Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Effekt von Phyto- und Sexualhormonen
auf den osteoporotischen Knochen
der männlichen Rattentibia**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Doreen Bohnsack

aus

Kyritz

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Hufner

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. Nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Mai. 2011

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Osteoporose – kurze Literaturübersicht.....	2
2.1	Knochen	2
2.2	Osteoporose.....	5
2.2.1	Definition und Epidemiologie	5
2.2.2	Ursachen und Diagnostik.....	6
2.2.3	Krankheitsfolgen und Therapie.....	7
2.2.4	Strukturelle Knochenveränderungen der Osteoporose.....	9
2.3	Sexualhormone	10
2.4	Phytoöstrogene.....	15
2.5	Ratten als Tiermodell für die Osteoporose.....	17
3.	Material und Methoden.....	19
3.1	Versuchstiere.....	19
3.2	Versuchsaufbau.....	19
3.3	Orchiektomie und Identifizierung der Tiere.....	20
3.4	Tierfutter	21
3.5	Herstellung der Hartschnittpräparate und Goldner-Färbung	21
3.6	Versuchsauswertung	23
3.7	Messgrößen für die Kortikalis und Spongiosa.....	23
3.8	Statistik.....	26
4.	Ergebnisse	27
4.1	Futteraufnahme und Körpergewicht.....	27
4.2	Effekte auf die Kortikalis	28
4.3	Effekte auf die Spongiosa	29
5.	Diskussion.....	34
5.1	Futteraufnahme und Körpergewicht.....	34
5.2	Veränderungen des Knochens nach Orchiektomie in der SF-Gruppe	35
5.3	Wirkung der Testsubstanzen auf den osteoporotischen Knochen.....	36
5.3.1	Wirkung der Sexualhormone auf den Knochen	36
5.3.2	Wirkung der Phytoöstrogene auf den Knochen.....	42
6.	Zusammenfassung	46
7.	Anhang	48
7.1	Ergebnistabellen	48
7.2	Tabellenverzeichnis.....	53
7.3	Abbildungsverzeichnis	53
8.	Literaturverzeichnis.....	55

Abkürzungsverzeichnis

↑	Zunahme/Anstieg
↓	Abnahme/Abfall
Abb.	Abbildung
AR bzw. AR-Rezeptor	Androgenrezeptor
BMD	Knochendichte bzw. bone mineral density
d	Tag
DEXA	Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
E2	17 β -Östradiol bzw. Estradiolbenzoat
EQ	Equol
ER bzw. ER-Rezeptor	Östrogenrezeptor
ER α bzw. ER α -Rezeptor	Östrogenrezeptor α
ER β bzw. ER β -Rezeptor	Östrogenrezeptor β
et al.	et alii
EZM	Extrazellulärmatrix
Fa.	Firma
Feret	Feretdiameter bzw. Feretdurchmesser (Parameter für die Trabekelgröße)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GEN	Genistein
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
HRT	Hormone replacement therapy bzw. Hormonersatztherapie
KG	Körpergewicht
Kompakt	Compactness bzw. Kompaktheit (Parameter für die Trabekelverzweigung)
LH	luteinisierendes Hormon
mediane TbA	mediane Trabekelfläche (Parameter für die Trabekelgröße)
n	Anzahl bzw. Stichprobenumfang
NIH	National Institute of Health
Orx bzw. orx	Orchiektomie bzw. orchiektomiert
Ovx bzw. ovx	Ovariektomie bzw. Ovariektomiert
p	Signifikanzniveau
PTH	Parathormon
25%Pz	25% Perzentil
75%Pz	75% Perzentil
RANKL	Receptor Activator of NF κ B Ligand
Runx2	Runt-related transcription factor 2
s.c.	subkutan
S.D.-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
SF	sojafrei
SHBG	Sexualhormon-Bindeglobulin
STDAB	Standardabweichung
STF	Standardfehler
Tb	Trabekel
%TbA bzw. %Tbfläche	prozentuale Trabekelfläche
TbN	Trabekelanzahl
Tab.	Tabelle
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

Die häufigste Stoffwechselerkrankung des Knochens ist die Osteoporose, die mit einer Abnahme der Knochensubstanz einhergeht und zu Frakturen, vornehmlich der Wirbelkörper und der langen Röhrenknochen, führen kann. Die Osteoporose manifestiert sich meist physiologisch im Rahmen des Alterungsprozesses und bei der Frau durch die Menopause, die mit einem Abfall des Östrogenspiegels verbunden ist.

In Deutschland sind 7,8 Millionen Menschen von der Osteoporose betroffen, von ihnen erleiden fast 5% eine Fraktur. Insbesondere die resultierenden Knochenbrüche stellen ein schwerwiegendes Ereignis für die Erkrankten dar, denn sie gehen oft mit einer eingeschränkten Lebensqualität einher. Die Europäische Kommission schätzt, dass es bis 2040, nicht zuletzt wegen der demographischen Entwicklung, zu einem Anstieg der Inzidenz für Hüftfrakturen auf 240.000/Jahr kommen wird (140.000 im Jahr 2000) (Häussler et al. 2007). Die dabei entstehenden Gesundheitskosten machen die Osteoporose zu einem bedeutenden volkswirtschaftlichen Problem. Eine adäquate Therapie der Osteoporose zur Verhinderung der weitreichenden Folgen ist daher in jeder Hinsicht absolut notwendig.

Epidemiologische Studien belegen, dass die asiatische Bevölkerung weitaus seltener an Osteoporose erkrankt als die europäische. Ein Erklärungsversuch dafür liefern die Phytoöstrogene im Sojaprotein.

Phytoöstrogene, die pflanzliche Östrogene darstellen, werden daher aktuell als mögliche alternative Therapieoption in der Osteoporosetherapie diskutiert. Aufgrund ihrer pflanzlichen Herkunft erhofft man sich eine gute Verträglichkeit und ein besonders günstiges Nebenwirkungsprofil, was sie als Therapeutikum mehr als nur willkommen machen würde.

Der Schwerpunkt der Forschung lag bislang bei der Osteoporose der Frau, die durch den postmenopausalen Östrogenmangel häufiger von der Erkrankung betroffen ist. Nichtsdestotrotz liegt der Anteil betroffener Männer bei 1/5. Erhobene Resultate in der Osteoporoseforschung der Frau lassen sich nicht ohne weiteres auf Männer übertragen, da es geschlechtsspezifische Unterschiede im Knochenstoffwechsel von Männern und Frauen gibt.

Während die Osteoporose der Frau hinsichtlich ihrer Ätiologie und Pathophysiologie weitestgehend geklärt scheint, sind die Mechanismen der männlichen Osteoporose sowie ihre Therapie noch nicht hinlänglich beschrieben. Ziel der Studie war es daher, die Wirkung der Sexualhormone Dihydrotestosteron und Östrogen sowie der Phytoöstrogene Genestein und Equol auf den männlichen, osteoporotischen Knochen zu untersuchen.

2. Osteoporose – kurze Literaturübersicht

2.1 Knochen

Das Knochenskelett bildet das Gerüst des Bewegungsapparates, schützt innere Organe und stellt darüber hinaus den größten Kalziumspeicher und das Knochenmark des Menschen bereit.

An den langen Röhrenknochen können Diaphyse (Schaft) und Epiphyse (Endstück) unterschieden werden, die bei einem wachsenden Knochen durch die Wachstumsfuge getrennt sind. Die Metaphyse ist die trichterförmige Erweiterung des Schafts in unmittelbarer Nachbarschaft zur Wachstumsplatte.

Im Bereich der Epi- und Metaphyse der langen Knochen findet man vor allem Spongiosa, die von einer dünnen Kompakta umgeben ist, während die Diaphyse fast vollständig aus der Substantia compacta aufgebaut ist (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Spongiosa ist ein Gitterwerk aus dünnen Platten und Bälkchen (Trabekel) im Inneren des Knochens, das aus parallel zur Trabekeloberfläche ausgerichteten Knochenlamellen

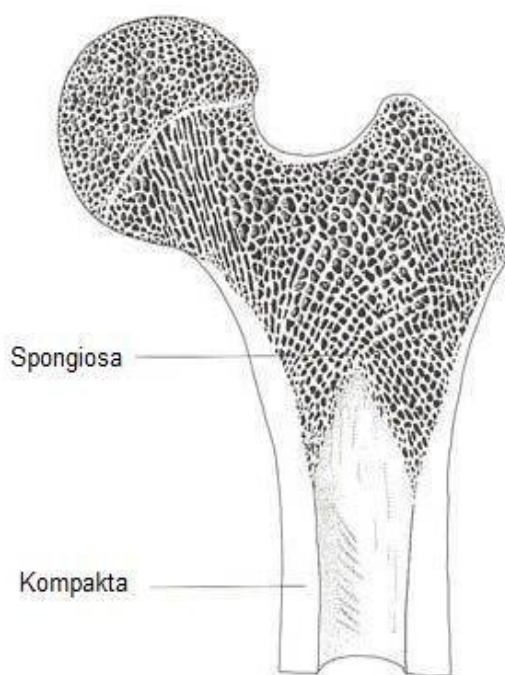


Abb. 1 Längsschnitt durch den Femurkopf mit Darstellung der Kompakta und Spongiosa (Quelle: modifiziert nach www.visualhistology.com, 2010).

besteht. Die Maschen zwischen den Trabekeln sind mit Knochenmark gefüllt.

Die Kompakta stellt die homogen erscheinende Rindenschicht (Kortikalis) eines Knochens dar. In der Kompakta sind die Lamellen konzentrisch um Gefäße herum angeordnet. Die Gefäße liegen in sogenannten Havers-Kanälen, die longitudinal in der Kortikalis verlaufen. Querverbindungen werden als Volkmann-Kanäle bezeichnet. Auf der engen räumlichen Beziehung zwischen Gefäßen

und Knochenlamellen beruht das Bauprinzip der Osteone, aus denen die Kompakta besteht. Ein Osteon ist ein System aus 5-20 Knochenlamellen, die konzentrisch um einen Havers-Kanal herumgeschichtet sind. Die Kollagenfibrillen in den Osteon-Lamellen verlaufen in Schraubentouren, deren Drehrichtung von einer zur anderen Lamelle wechselt. Die Räume zwischen den Osteonen sind mit Schaltlamellen gefüllt, die die

Reste von alten Osteonen und den histologischen Ausdruck des stetigen Knochenumbaus darstellen.

Im äußeren Bereich der Kompakta sind die Lamellen nicht in Osteonen organisiert, sondern umfassen kontinuierlich die ganze Zirkumferenz des Knochens (Generallamelle). Nach Außen wird die Kortikalis durch die äußere Generallamelle sowie den Periost, nach Innen durch die innere Generallamelle sowie den Endost begrenzt (Schiebler und Schmidt 2002).

Histologisch betrachtet, besteht das Knochengewebe aus mineralisierter Extrazellulärmatrix (EZM) und verschiedenen Zelltypen.

Die EZM ist aus organischen Kollagenfibrillen (Kollagen Typ I) und anorganischen Hydroxylapatit-Kristallen aufgebaut. Die Hydroxylapatit-Kristalle bestehen vorwiegend

aus Calciumphosphat (85%). Die Ausrichtung der Kristalle wird von den Kollagenfibrillen bestimmt, die im reifen Knochengewebe in histologisch erkennbaren Lamellen angeordnet sind. Eine Knochenlamelle ist eine 3-5 µm dicke Schicht, die aus gleichsinnig ausgerichteten, mineralisierten Kollagenfibrillen besteht (Lüllmann-Rauch 2003).

Der Knochen zeichnet sich aufgrund seiner Architektur durch eine besonders hohe Druck- und Zugfestigkeit aus. Das Knochengewebe wird den hohen Ansprüchen durch einen

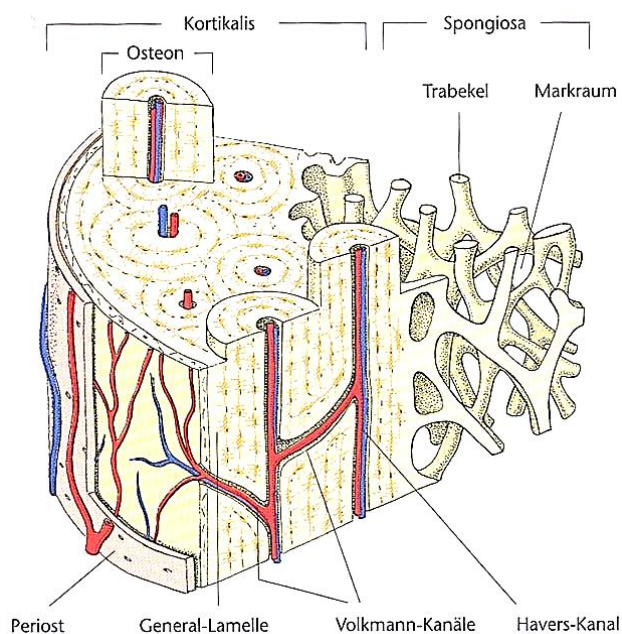


Abb. 2 Schematische Darstellung des Knochenaufbaus: Die äußere Kortikalis bestehend aus Osteonen und Schaltlamellen wird von der Generallamelle und dem Periost umgeben, im Inneren des Knochens befindet sich die Spongiosa, die aus Trabekeln (Knochenbälkchen) aufgebaut ist (Quelle: www.biofachforum.ch, 2010).

ständigen Prozess des Auf- und Abbaus gerecht, für den die Osteoblasten, aus denen die Osteozyten hervorgehen, und die Osteoklasten verantwortlich sind.

Die Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Stammzellen ab. Sie sitzen in einer einschichtigen Lage dicht aneinandergereiht nahe der mineralisierten Matrix, von der sie durch eine Schicht nicht-mineralisierter Kollagenfibrillen getrennt sind. Die Osteoblasten synthetisieren das zum Aufbau der EZM benötigte Kollagen, organisieren die Mineralisation und regulieren die Osteoklastenfunktion. Von den Enden ihrer Ausläufer schnüren sich Vesikel ab, in denen sich nach Ionenanreicherung die ersten

Hydroxylapatit-Kristalle bilden, wobei organische Moleküle als Kristallisationsausgangspunkt dienen. Die Kristalle wachsen spontan, bis sie die Vesikelmembranen zerreißen. Im Extrazellulärraum wachsen die Kristalle weiter und lagern sich an Kollagenfibrillen an (Lüllmann-Rauch 2003). Osteoblasten werden zu Osteozyten, wenn sie sich durch die Prozesse der Mineralisation infolge der Lamellenbildung einmauern.

Die Osteozyten sind ganz von mineralisierter Matrix umgeben. Sie liegen in einem Hohlraumsystem. Zwischen den Lamellen befinden sich linsenförmige Lakunen, von denen Knochenkanälchen (Canaliculi) abgehen. In den Lakunen liegen die Osteozytenzelleiber und in den Kanälchen ihre Ausläufer, durch die die Osteozyten untereinander über *gap junctions* verbunden sind. (Schiebler und Schmidt 2002).

Die Osteoklasten sind 50-100µm große, mehrkernige Zellen, die vom Monozyten-Phagozyten-System stammen. Sie entstehen durch Fusion von bis zu 100 einkernigen Vorläuferzellen. Der aktive Osteoklast liegt der mineralisierten Matrix direkt an. Die Osteoklasten lösen die Calciumverbindungen durch Säure auf (H^+ -ATPase), sezernieren lysosomale Enzyme, u.a. Cathepsin K zur Zerlegung der organischen Matrix und nehmen durch rezeptorvermittelte Endozytose Matrix-Fragmente auf (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten wird durch unterschiedliche Signalkaskaden reguliert.

Osteoblasten sezernieren den RANK-Liganden (RANKL, *Receptor Activator of NFκB Ligand*), welcher am RANK-Rezeptor der Osteoklasten bindet, die Proliferation der Osteoklastenvorläufer anregt und die Fusion der Vorläufer induziert. Die Synthese des RANKL-Proteins in den Osteoblasten wird über einen erhöhten Parathormonspiegel bzw. einen Vitamin-D3-Mangel stimuliert (Pietschmann et al. 2004), wohingegen Östrogen die Synthese inhibiert und so die Knochenresorption verhindert (Frenkel et al. 2010).

Mesenchymale Zellen produzieren außerdem den FAS-Liganden (FASL), welcher an einen proapoptotischen FAS-Rezeptor der Osteoklasten bindet und zum programmierten Zelltod führt. Östrogen wirkt stimulierend auf die Expression von FASL, der zur beschleunigten Apoptose der Osteoklasten führt (Krum et al. 2008). Die Anzahl der Osteoklasten nimmt ab, es kommt zu einer verminderten Knochenresorption durch Östrogen. Die Hemmung der Osteoklasten erfolgt auch über das Hormon Calcitonin, nach dessen Bindung die Osteoklasten in einen Ruhezustand gehen. Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*) wird ebenfalls von Osteoblasten synthetisiert und ist der Hauptregulator der Osteoblastendifferenzierung und somit des Knochenaufbaus (Ducy et al. 1997). Darüber hinaus fördert Runx2 jedoch auch die Osteoklastogenese (z.B. über ↑ RANKL) und so die Knochenresorption. Die Wirkung ist von der Aktivität des Runx2 abhängig. Ein ausgeglichener Knochenmetabolismus

benötigt eine strenge Regulation der Runx2-Aktivität, denn eine abgeschwächte Aktivität führt zu einer unzureichenden Osteoblastendifferenzierung und damit zu einem unzureichenden Knochenaufbau. Auf der anderen Seite kommt es bei zu hoher Aktivität zu einer verstärkten Osteoklastendifferenzierung und dadurch zur Knochenresorption (Geoffroy et al. 2002).

Physiologischerweise besteht ein feinabgestimmtes Gleichgewicht zwischen der Knochenformation durch die Osteoblasten und der Knochenresorption durch die Osteoklasten. Eine Dysbalance geht mit einer pathologischen Veränderung der Knochenmasse, -struktur und -funktion einher. Diese Dysbalance kommt beim Menschen am häufigsten im Rahmen der Osteoporose vor.

2.2 Osteoporose

2.2.1 Definition und Epidemiologie

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Dies führt zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und Frakturanfälligkeit (NIH 2001).

Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehört die Osteoporose zu den 10 wichtigsten Volkserkrankungen. Sie stellt die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter dar, an der Schätzungen zufolge ca. 75 Millionen Menschen in Europa, den USA und Japan leiden.

Für Deutschland wird die Prävalenz der über 50jährigen Bevölkerung mit 25,8% (ca. 7,8 Mio.) angegeben. Der Anteil betroffener Männer liegt bei 17%. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung wird die Häufigkeit der Osteoporose, insbesondere bei Männern, in den kommenden Jahren deutlich zunehmen. Laut Schätzungen könnten in 6 Jahren knapp 40% der über 50jährigen an Osteoporose erkrankt sein (Häussler et al. 2006).

Darüber hinaus trägt die Osteoporose, mit jährlich etwa 1,8 Mrd. Euro an direkten und indirekten Krankheitskosten in Deutschland, eine große volkswirtschaftliche Bedeutung. Das sind etwa 20 Euro jährlich für jeden Bundesbürger. Außerdem gehen jedes Jahr 2000 Erwerbsfähigkeitsjahre durch die Erkrankung verloren (Statistisches Bundesamt 2006).

Die Osteoporose ist ein demographisches, ökonomisches und gesellschaftliches Erkrankungsbild, das zunehmend auch die männliche Bevölkerung betrifft und eine weitergehende Erforschung erforderlich macht.

2.2.2 Ursachen und Diagnostik

Generell unterscheidet man zwei wesentliche Formen der Osteoporose: die primäre und die sekundäre Form.

Zur primären Osteoporose zählen die postmenopausale, senile, sowie die selten auftretende idiopathische Osteoporose. Sie umfassen ca. 95% der auftretenden Fälle. Die postmenopausale Osteoporose (Typ I) tritt bei Frauen zwischen dem 50.-70. Lebensjahr auf. Ursächlich für den Knochensubstanzverlust ist der nach der Menopause einsetzende Mangel des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen. Der Knochenverlust betrifft überwiegend die spongiösen Anteile des Knochens und weniger die Kortikalis (Herold et al. 2005).

Die senile Osteoporose (Typ II) kommt bei Männern und Frauen im Verhältnis von 1:2 ab dem 60. Lebensjahr vor. Als Ursache sind altersbedingte Veränderungen, die in einer Reduktion der Sexualhormone Östrogen und Testosteron münden, anzuschuldigen. Beim Typ II findet sich ein Verlust an trabekulärer und kortikaler Knochensubstanz gleichermaßen (Herold et al. 2005).

Bei der sekundären Osteoporose liegt die Ursache in einer anderen zugrunde liegenden Erkrankung. Darunter fallen endokrine Störungen wie Hyperkortisolismus, Hypogonadismus, Hyperthyreose sowie Malabsorptionssyndrome, aber auch die chirurgisch bedingte Osteoporose.

In dieser Studie wird die altersbedingte Osteoporose des Mannes betrachtet.

Die Diagnose der Osteoporose stellt sich im Wesentlichen aus der Klinik und der Osteodensometrie (Knochendichtemessung). Patienten stellen sich mit Schmerzen, insbesondere im Rücken oder mit pathologischen Frakturen vor. Dabei handelt es sich um Frakturen ohne adäquates Trauma, die meistens am Schenkelhals oder an den Wirbelkörpern auftreten. Durch Sinterungsfrakturen an der Wirbelsäule kann es zu einem Rundrücken, Gibbusbildung und Abnahme der Körpergröße von >4cm kommen. Durch das veränderte Knochenskelett treten häufig chronische Schmerzen aufgrund von Fehlbelastungen und Verspannungen auf.

Die Methode der Wahl zur Diagnose einer Osteoporose ist die Osteodensometrie. Das wichtigste Verfahren ist die Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie (DEXA) (Blake und Fogelman 2007). Im Vergleich zum herkömmlichen Röntgenverfahren werden gleichzeitig zwei energetisch leicht unterschiedliche Röntgenquellen eingesetzt, wodurch eine Abschwächung verschiedener Materialien genauer unterschieden werden kann. Es liefert keine Information über die dreidimensionale Geometrie des Messobjektes und somit keine Dichtewerte im physikalischen Sinne, sondern eine flächenprojizierte Masse (SI-Einheit: kg/m^2 , auch als Flächendichte bezeichnet).

Da die verschiedenen Verfahren der Osteodensometrie nicht vergleichbar sind, wird das Ergebnis als T-Wert (*T-Score*) angegeben. Der T-Wert ist eine dimensionslose, statistische Größe, die die Abweichung vom Mittelwert der Knochendichte (*bone mineral density*, BMD) eines gesunden 30jährigen Referenzkollektivs angibt.

Nach der gültigen Definition der WHO liegt eine Osteoporose dann vor, wenn der Messwert der Knochendichtemessung mindestens 2,5 Standardabweichungen unter dem Durchschnitt der geschlechtsgleichen 30jährigen Gesunden (*peak bone mass*) liegt. Von einer Osteopenie spricht man bei T-Werten zwischen -1 und -2,5 Standardabweichungen (WHO 1994).

Die Knochendichtemessung ist hoch prädiktiv für das Frakturrisiko als Krankheitskomplikation der Osteoporose. Niedrige BMD-Werte korrelieren stark mit einem erhöhten Risiko für eine Fraktur (Cummings et al. 2006).

Zur Diagnosesicherung einer primären Osteoporose gehört immer der Ausschluss möglicher anderer Erkrankungen, die für die verminderte Knochendichte verantwortlich sein könnten. Dazu ist eine laborchemische Untersuchung unabdingbar. Angemerkt sei noch, dass die Osteoporose bei Männern sehr selten diagnostiziert und therapiert wird (Feldstein et al. 2005). Die männliche Osteoporose ist daher wahrscheinlich weitaus verbreiteter als angenommen.

2.2.3 Krankheitsfolgen und Therapie

Frakturen repräsentieren die primäre klinische Konsequenz der Osteoporose, die es letztlich zu verhindern gilt. Bei beiden Geschlechtern ist ein rasanter Anstieg der Frakturhäufigkeit ab dem 75. Lebensjahr zu verzeichnen (Singer et al. 1998). Insbesondere Frakturen der Wirbelsäule, des Femurs, des Radius, der Ulna und des Humerus treten vermehrt in höherem Alter auf. Daher werden sie verstärkt mit der Osteoporose in Zusammenhang gebracht (van Staa et al. 2001).

Die verheerende Brisanz der osteoporotischen Frakturen liegt in der deutlich eingeschränkten Alltagsfähigkeit und Lebensqualität der Patienten. Darüber hinaus führen sie zu einem erhöhten Krankenstand und einer höheren Sterberate.

Die größte Bedeutung haben hier hüftgelenksnahe Frakturen, die insbesondere für Männer die höchsten Morbiditäts- und Mortalitätsraten zeigen. Das männliche Geschlecht ist bis zu 30% von Hüftfrakturen betroffen (Johnell und Kanis 2006). Derartige Frakturen weisen bei Männern eine 1-Jahres-Mortalitätsrate von 31-35% auf, bei Frauen hingegen nur 17-22% (Forsen et al. 1999).

Laut Melton et al. erleidet jeder 8. Mann nach dem 50. Lebensjahr eine Fraktur, die im Zusammenhang mit der Osteoporose steht (Melton et al. 1992). Aufgrund der hohen

Prävalenz und der schwerwiegenden Folgen ist es wichtig, frühzeitig auf eine Prävention, Diagnostik und Therapie der Osteoporose, insbesondere beim Mann, hinzuwirken.

Die Therapie der primären Osteoporose besteht aus unterschiedlichen Säulen, zu denen die Basistherapie, die spezielle medikamentöse Therapie sowie die Schmerztherapie gehören.

Zur Basistherapie gehört die Umsetzung der Empfehlungen zur Osteoporose- bzw. Frakturprophylaxe. Darunter fallen Maßnahmen zur Förderung der Muskelkraft und Koordination, die Senkung des Sturzrisikos sowie die Substitution von Vitamin D₃ und Calcium. Alle prophylaktischen Maßnahmen wirken rasch. Die Wirkung ist jedoch auf die Zeitdauer der Durchführung begrenzt.

Die Einleitung einer speziellen medikamentösen Therapie ist abhängig vom Ausmaß der Knochendichterniedrigung, dem Geschlecht und Lebensalter sowie weiteren Risikofaktoren. Es kommen Medikamente zum Einsatz, die den Knochenstoffwechsel günstig beeinflussen und die Abnahme der Knochensubstanz verlangsamen oder aufhalten können. Hierzu zählen die Wirkstoffgruppen der Bisphosphonate, selektiver Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), Strontiumranelat und Parathormon (PTH) (DVO-Leitlinien 2009).

Bisphosphonate greifen in den Knochenstoffwechsel zum einen durch die Hemmung der Mineralisation und zum anderen durch die Verhinderung des Knochenabbaus ein. Sie lagern sich der Knochenoberfläche an, werden von Osteoklasten phagozytiert, wirken nach intrazellulärer Anreicherung zelltoxisch und führen zur Apoptose der Osteoklasten (Lüllmann et al. 2006). Bisphosphonate wirken also insgesamt antiresorptiv. Die frakturverhindernde Wirkung der Vertreter Aldendronat (Fosamax®) und Risedronat (Actonel®) ist sowohl für Frauen als auch für Männer belegt (Orwoll et al. 2000, Sato et al. 2005).

Die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs), wie Raloxifen (Evista®), wirken gewebespezifisch östrogenagonistisch oder –antagonistisch. Der Wirkstoff bildet einen Komplex mit dem Östrogenrezeptor, der sich an die DNA anlagert und weitere Co-Regulatoren der Genexpression rekrutiert. Entsprechend dem Muster der involvierten Co-Faktoren entfalten SERMs ihre gewebespezifische Wirkung (Lüllmann et al. 2006). SERMs haben auf Knochen und Fettstoffwechsel eine vergleichbare Wirkung mit Östrogen, während die Wirkung an Mamma, Uterus und Prostata antiöstrogen ist. Raloxifen reduziert bei postmenopausalen Frauen die Häufigkeit aller klinisch relevanten Frakturen (Kanis et al. 2010). Studien lassen zwar einen positiven Effekt bei männlichen Osteoporosepatienten vermuten (Doran et al. 2001), zugelassen ist Raloxifen für Männer bisher jedoch nicht.

Obwohl Östrogene eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Osteoporose spielen, sind Studien bezüglich ihrer therapeutischen Wirkung bei Männern, insbesondere aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen (Feminisierung, Gynäkomastie), bisher nicht durchgeführt worden. Bei Frauen kommt eine Östrogen-Monotherapie wegen dem Auftreten starker Nebenwirkungen nur noch in seltenen Einzelfällen zum Einsatz. Östrogene stellen zwar eine sehr effektive Therapie der Osteoporose dar, weil sie nachweislich die Inzidenz von Oberschenkel- und Wirbelfrakturen sowie postmenopausale Symptome senken. Ihre karzinogene Wirkung auf die Mamma, Ovarien und das Endometrium, sowie das gehäufte Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, wie venöse Thromboembolien und Schlaganfälle, bewirkten jedoch ein Abwenden von dieser Therapiestrategie (Rossouw et al. 2002).

Insgesamt stehen zur Behandlung der Osteoporose des Mannes nur wenige Medikamente zur Verfügung. Der Einsatz von Phytoöstrogenen wird aktuell als eine sehr vielversprechende Therapieoption diskutiert. Hierbei handelt es sich um Substanzen auf pflanzlicher Basis, die in ihrer Wirkung den SERMs ähneln. Ihre Wirkung auf den Knochen und ihr therapeutischer Nutzen in der Behandlung der Osteoporose des Mannes sollen im Zentrum unserer Studie stehen.

2.2.4 Strukturelle Knochenveränderungen der Osteoporose

Im Alterungsprozess kommt es zu strukturellen Veränderungen des Knochens. Die Knochenmineraldichte nimmt mit dem Alter stark ab und ist damit hauptursächlich für die Entstehung der Osteoporose anzusehen. Doch auch die Knochengröße, die Geometrie und Mikrostruktur des Knochens verändern sich mit zunehmendem Lebensalter. Diese Veränderungen sind teilweise geschlechtsspezifisch.

Die Knochendichte der Kortikalis bleibt bei Männern und Frauen bis ins mittlere Alter annähernd konstant, wobei Frauen eine höhere Knochendichte der Kortikalis zeigen als gleichaltrige Männer. Männer hingegen weisen eine größere Kortikalisdicke auf. Nach dem 60. Lebensjahr kommt es zu einem fast linearen Abfall der Knochendichte bei beiden Geschlechtern. Dieser Abfall ist bei Frauen deutlich stärker ausgeprägt. Während Frauen ca. 28% ihrer kortikalen Knochendichte verlieren, sind es bei Männern lediglich 18% (Riggs et al. 2004).

Während des Alterungsprozesses kommt es außerdem zu einer Zunahme der Knochenquerschnittsfläche und einer noch stärkeren Zunahme der Knochenmarksfläche innerhalb des Knochens. Diese Beobachtung wird durch den kontinuierlichen, lebenslangen, periostalen Knochenanbau sowie die parallel - und im Vergleich zum Anbau - viel stärkere Knochenresorption im endostalen Bereich erklärt. Daraus resultiert insgesamt eine Abnahme der Kortikalisfläche bzw. -dicke und es kommt zu einer

Verlagerung der Kortikalis nach außen. Da der periostale Knochenanbau bei Männern stärker ist als bei Frauen, resultiert beim männlichen Geschlecht ein geringerer Knochenverlust (Duan et al. 2001). Durch die Verschmälerung der Kortikalis verliert der Knochen im Alter an Stabilität. Dieser Verlust wird durch die Verlagerung der Kortikalis teilweise ausgeglichen, da der Knochen durch den größeren Querschnitt widerstandsfähiger wird.

Auch die Knochendichte der Trabekel nimmt im Laufe des Lebens ab, allerdings beginnt die Minderung sehr viel früher – bereits im jungen Erwachsenenalter. Prämenopausale Frauen zeigen auch hier eine deutlich höhere Knochendichte im Vergleich zu gleichaltrigen Männern. Auffällig ist eine drastische Beschleunigung der Knochendichteabnahme der Frauen um die Menopause. Insgesamt mindert sich die Knochendichte der Trabekel bei Männern um ca. 45%, die der Frauen bis zu 55% (Riggs et al. 2004).

Mikrostrukturelle Veränderungen des Knochens zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede, wie die genauere Analyse der Trabekelstrukturen zeigen konnte.

Die Abnahme des Trabekelvolumens ist bei beiden Geschlechtern vergleichbar stark ausgeprägt. Während Männer im Alterungsprozess zu einer Minderung der Trabekeldicke tendieren, zeigten Frauen eine stärkere Abnahme der Trabekelanzahl und ihrer Verzweigungen (Khosla et al. 2006).

Daraus kann geschlossen werden, dass die bei beiden Geschlechtern auftretende Minderung des Trabekelvolumens in unterschiedlichen Ursachen begründet liegt. Männer verlieren überwiegend an Trabekeldicke, während bei Frauen die Anzahl der Trabekel abnimmt. Die Trabekelanzahl hat im Vergleich zur Trabekeldicke einen größeren Effekt auf die Knochenstärke (Silva und Gibson 1997). Diese mikrostrukturellen Knochenveränderungen während des Alterungsprozesses könnten daher das geringere Frakturrisiko bei Männern im höheren Alter erklären.

2.3 Sexualhormone

Sexualhormone lassen sich in vier funktionelle Gruppen einteilen. Dazu zählen die Gestagene, Östrogene, Androgene und Corticosteroide. Die Produktion der Steroidhormone findet überwiegend in den Ovarien der Frau, den Testes des Mannes und darüber hinaus auch in der Nebennierenrinde statt.

Die Synthese der Steroidhormone geht vom Cholesterin aus. Als ihre gemeinsame Struktureinheit ist das Sterangerüst anzusehen. In der Biosynthese wird als Zwischenprodukt stets das Progesteron gebildet.

Steroidhormone sind lipophil und hydrophob, wodurch sie zum einen im Blutstrom auf Transportmoleküle angewiesen sind, zum anderen jedoch durch ihre gute Fettlöslichkeit

die Zellmembran eigenständig durchdringen können und für die intrazelluläre Signalvermittlung keinen *second messenger* benötigen.

Steroidhormone wirken, indem sie mit transkriptionsregulierenden Rezeptoren interagieren und so die Proteinsynthese beeinflussen. Die Hormone gelangen in das Zellinnere und bilden mit den intrazellulären Rezeptoren einen Steroid-Rezeptor-Komplex, der in den Zellkern gelangt, sich in Form homodimerer Komplexe an spezifische DNA-Abschnitte anlagert und auf diese Weise die Transkription entsprechender Gene reguliert.

Steroidhormone werden durch die Metabolisierung in der Leber inaktiviert, indem sie reduziert und mit Glukuronsäure konjugiert werden. Nach der hepatischen Eliminierung können sie den enterohepatischen Kreislauf durchlaufen und so dem Stoffwechsel wieder zur Verfügung stehen.

An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass es keine geschlechtsspezifischen Hormone gibt. Der geschlechtsspezifische Unterschied besteht in der Menge an produziertem und freiem Sexualhormon und in der Reaktivität des Körpers auf die Sexualhormone.

Androgene

Das Androgen Testosteron wird bei Männern in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens gebildet. Die Stimulation der Synthese erfolgt über das luteinisierende Hormon (LH) der Hypophyse, welches wiederum durch das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) des Hypothalamus reguliert wird. Über einen negativen Feedbackmechanismus hemmt Testosteron in der Hypophyse die Sekretion von LH und im Hypothalamus die Ausschüttung des GnRHs.

Die Wirkung des Testosterons wird durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Zum einen wirkt Testosteron direkt

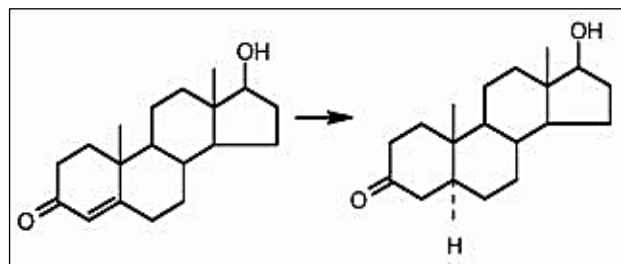


Abb. 3 Metabolisierung von Testosteron (links) in Dihydrotestosteron (rechts) (Quelle: Rohr et al. 2008, S.25).

über Androgenrezeptoren (AR-Rezeptoren), welche ubiquitär im Organismus vorkommen. Zum anderen kann Testosteron auch durch die 5 α -Reduktase in das 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt werden, welches eine vielfach höhere Affinität zum AR-Rezeptor aufweist als Testosteron selbst (Kumar et al. 1999). Darüber hinaus kann Testosteron seine Wirkung in Form von Östradiol vermitteln, da es durch das Enzym Aromatase in Östradiol umgewandelt werden kann. Dies geschieht vor allem in der Leber und im subkutanen Fettgewebe (Simpson et al. 1994).

Testosteron, das wichtigste Sexualhormon des Mannes, entscheidet bereits in der fetalen Entwicklung durch seine Anwesenheit über die Ausbildung der Genitalien. Mangelt es während der Fetalentwicklung an Testosteron, entsteht das weibliche Genital. Der Testosteronspiegel steigt erst zu Beginn der Pubertät stark an und stimuliert das Wachstum der männlichen Fortpflanzungsorgane, die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und fördert zudem die Ausreifung der Spermien in den Sertoli-Zellen des Hodens. Der Serum-Testosteronspiegel liegt bei Männern durchschnittlich zwischen 3,5-8,6µg/l, bei Frauen mit bis zu 0,86µg/l deutlich darunter.

Androgene beeinflussen maßgeblich das musculoskelettale Wachstum. Testosteron führt zu einer deutlichen Zunahme der Muskelmasse und fördert das Skelettlängenwachstum.

Während der Adoleszenz führen Androgene bei Männern zu einem verstärkten periostalen Knochenanbau und somit zu einer Zunahme der Kortikalisdicke (Seemann 2002). In der Spongiosa bewirken Androgene eine Steigerung der Trabekeldicke und sind darüber hinaus für die Aufrechterhaltung der Trabekelanzahl verantwortlich (Khosla et al. 2006).

Das in unserer Studie verwendete DHT ist das am stärksten wirkende Androgen und kann nicht durch die Aromatase in Östrogen umgewandelt werden (Wang und Swerdloff 2002). Es wurde daher nur die spezifische androgene Wirkung über AR-Rezeptoren am Knochen untersucht. In Studien an männlichen, orchiectomierten Ratten verhinderte Dihydrotestosteron den Verlust von kortikalen Knochen und teilweise den des trabekulären Knochens (Vanderschueren et al. 1992, Vandenput et al. 2002).

Östrogene

Die Östrogensynthese bei Männern findet in der Nebennierenrinde und zu einem großen Teil im Unterhautfettgewebe statt. Die Biosynthese erfolgt stets über die Zwischenstufen des Testosterons, welches durch Demethylierung in Position C10, Hydroxylierung an C3 und Aromatisierung des A-Ringes durch die Aromatase zu Östrogen umgewandelt wird. Die Hormonproduktion steht wie bei den Androgenen unter dem Kontrollmechanismus der hypophysären Hormone (FSH, LH).

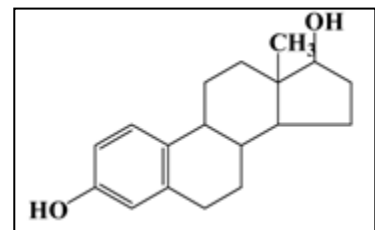


Abb. 4 Struktur von 17β-Östradiol (Quelle: Ha et al. 2010, S.629).

Östrogene vermitteln ihre Wirkung über die Östrogenrezeptoren. Den Subtypen ERα und ERβ kommt hierbei besondere Bedeutung zu. Der ERα dominiert im Gehirn, der Leber und den Nieren. Bei der Frau kommt er überwiegend in der Mamma und im Uterus vor, wohingegen der ERβ in den Ovarien überwiegt. Beim Mann überwiegt der

ER β in der Prostata und im Epididymis (Kostelac et al. 2003). Beide Subtypen werden im Knochengewebe exprimiert (Hou et al. 2006).

Östrogene vermitteln eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen, die nur teilweise durch das Zusammenspiel der Rezeptoren zu erklären ist. Vielmehr handelt es sich um einen komplexen Mechanismus der Metaboliten, der Rezeptoren und der Transkriptionsfaktoren.

Östrogen, das wichtigste weibliche Sexualhormon, ist für die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich. Es stimuliert die Brustentwicklung während der Pubertät und ist am regelrechten Ablauf des Menstruationszyklus beteiligt. Bei prämenopausalen Frauen liegt der Serum-Östradiolspiegel in Abhängigkeit vom Zyklusstadium zwischen 30-600pg/ml. Der Serum-Östradiolspiegel bei Männern liegt zwischen 10-50pg/ml.

Im Skelettsystem wirkt Östrogen stimulierend auf das Knochenwachstum und bewirkt den Schluss der Epiphysenfugen am Ende der Pubertät. Es ist für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse verantwortlich und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels. Seine antiresorptive Wirkung auf den Knochen entfaltet es wahrscheinlich über ER α (Kostelac et al. 2003).

Es gilt als allgemein anerkannt, dass Östrogen den Verlust von kortikalen und trabekulären Knochen verhindern kann, indem es u.a. einer Reduktion der Trabekelanzahl entgegenwirkt (Vandenput et al. 2002).

Hormonelle Veränderungen bei der Osteoporose des Mannes

Viele hormonelle Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Osteoporose des Mannes.

Die senile Osteoporose des Mannes entsteht zum einen durch die altersbedingte Abnahme der 1- α -Hydroxylase in der Niere, das in einer Abnahme des Calcitriol (Vitamin D)-Spiegels resultiert, was letztlich eine verminderte Kalziumresorption aus dem Darm bewirkt und eine Erhöhung des Parathormonspiegels induziert. Das PTH stimuliert die Synthese des RANKL-Proteins in Osteoblasten. Es entsteht ein Ungleichgewicht zu Gunsten der Knochenresorption.

Zum anderen spielen ebenfalls Transportmoleküle eine Rolle im Entstehungsprozess. Sexualhormone sind im Serum an Sexualhormon-Bindeglobuline (SHBG) oder an Albumin gebunden, in einer kleinen Fraktion kommen sie allerdings auch ungebunden vor. Der prozentuale Anteil von 1-3%, der frei in der Blutbahn zirkuliert und der Anteil, der an Albumin (35-55%) gebunden ist, ist schnell verfügbar und kann das Zielgewebe leicht erreichen, während die Sexualhormone, die an SHBG gebunden sind, einen eingeschränkten Zugriff auf das Zielgewebe haben (Hammond 2002).

Es konnte in Studien an Männern gezeigt werden, dass es im Alter zu einer signifikanten Abnahme der Testosteron- und Östrogenspiegel kommt, die ungebunden im Serum vorkommen. Gleichzeitig ist diese Abnahme mit einer Zunahme des SHBG-Spiegels assoziiert. Durch die vermehrte, vermutlich stärkere Bindung von Testosteron und Östrogen an SHBG, kommt es im Alter zu einer Abnahme der frei verfügbaren Sexualhormone, wodurch ihre Wirksamkeit reduziert ist und die Osteoporoseentstehung begünstigt wird (Orwoll et al. 2006).

Bei der Entstehung der Osteoporose bei Männern kommt nicht dem männlichen Sexualhormon, dem Testosteron, eine herausragende Bedeutung zu, sondern dem Östrogen. Die Abnahme der Knochendichte bei Männern ist stärker mit den bioverfügbaren Östrogenspiegeln assoziiert als mit den Testosteronspiegeln. Mehr noch, es scheint eine minimale Östrogenspiegelgrenze zu geben, die bei 11pg/ml liegt (Khosla et al. 2001), unter der der Knochenverlust deutlich mit den erniedrigten Östrogenspiegeln korreliert. Bei Männern mit bioverfügbaren Östrogenspiegeln unterhalb dieser Grenze zeigte sich eine deutliche Korrelation zum Knochenverlust, während sich bei Männern mit höheren Spiegeln keine Korrelation zwischen den Knochenverlusten und den Östrogenspiegeln finden ließ.

Die sich bei Männern im Alter entwickelnde testikuläre Insuffizienz führt zu einem erniedrigten Testosteron-Spiegel, wodurch dem im Fettgewebe vorkommenden Enzym Aromatase weniger Substrat zur Verfügung steht, um Östradiol zu synthetisieren. Ein erniedrigter Östradiolspiegel führt wiederum über die unterschiedlichen Signalkaskaden (FASL/FAS, RANKL/RANK, Runx2) zu einer Begünstigung der Knochenresorption.

Tierexperimente lassen vermuten, dass Östrogene ihre antiresorptive Wirkung scheinbar geschlechtsspezifisch über unterschiedliche Mechanismen entfalten.

In einem Knockoutmodell konnte gezeigt werden, dass der Signalweg des ER α in Osteoklasten zwar den trabekulären Knochenstoffwechsel der weiblichen Mäuse reguliert, nicht jedoch den der männlichen. Eine Beeinflussung des kortikalen Knochens durch diesen Signalweg konnte bei keinem Geschlecht gezeigt werden (Nakamura et al. 2007). Androgene spielen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle im Knochenstoffwechsel des Mannes. Sie selbst entfalten einen knochenprotektiven Effekt über die AR-Rezeptoren. Bei Untersuchungen an Männern, denen GnRH zur Induktion eines Hypogonadismus und Aromataseinhibitoren zur Hemmung der östrogenen Wirkung des Testosterons verabreicht wurden, wurde deutlich, dass der stärkste knochenprotektive Effekt durch die Substitution von Östrogen und Testosteron erzielt werden konnte, statt mit einem Sexualhormon allein (Falahati-Nini et al. 2000, Leder et al. 2003). Wahrscheinlich haben Androgene selbst ihre größte Bedeutung in der Adoleszenz. Sie steigern die Kortikalisdicke und wirken wahrscheinlich insbesondere bei jüngeren

Männern über die AR-Rezeptoren antiresorptiv, während bei älteren Männern die knochenschützende Wirkung mehr durch die Aromatisierung des Androgens zu Östrogen und dessen aktivierende Wirkung auf ER α vermittelt wird (Khosla und Riggs 2003).

Die Osteoporose des Mannes unterscheidet sich, wie bisher aufgeführt, in vielen Aspekten von der Osteoporose der Frau. Aus diesem Grund ist, trotz zahlreich vorliegender Studien der Osteoporose an Frauen, die Erforschung der männlichen Osteoporose mit Ehrgeiz weiterzuführen.

2.4 Phytoöstrogene

Asiaten zeigen eine geringere Inzidenz für Brust-, Endometrium-, Ovarial- und Prostatakrebs, sowie ein reduziertes Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen und Osteoporose. Ursächlich verantwortlich dafür könnten Phytoöstrogene sein, die bei japanischen Frauen und Männern in deutlich höheren Plasmakonzentrationen vorliegen als in der europäischen Bevölkerung (Morton et al. 2002).

Phytoöstrogene sind pflanzliche Substanzen mit östrogenähnlicher Wirkung, zu denen Isoflavone, Lignane und Coumestane gehören. Isoflavone sind charakteristische Inhaltsstoffe der Hülsenfrüchte. Besonders reichhaltig kommen sie in Sojabohnen vor, die ein Hauptbestandteil der asiatischen Ernährung sind. Klassische Vertreter sind Genistein, Daidzein und Equol.

Chemisch betrachtet handelt es sich um heterozyklische Aromaten, die eine phenolische Hydroxyl-Gruppe in ihrem Ringsystem aufweisen. Ihre chemische Struktur ähnelt der des Östrogens und erklärt die Bindungsfähigkeit der Isoflavone an die Östrogenrezeptoren ER α und ER β (Morito et al. 2001). Isoflavone zeigen an den Östrogenrezeptoren sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkung. Sie entfalten ihre östrogene Wirkung also im Sinne eines SERMs (Oseni et al. 2008).

Phytoöstrogene wirken knochenprotektiv, wie in Studien an orchiektomierten und ovariectomierten Tieren, sowie bei post- und prämenopausalen Frauen nachgewiesen werden konnte (Ishimi et al. 2002, Mathey et al. 2004, Marini et al. 2007, Kwak et al. 2009).

Östrogene Wirkungen der Isoflavone auf die Mamma und den Uterus scheinen bei Frauen nur schwach hervorgerufen zu werden (Xu et al. 2009). Sie werden daher aktuell als lukrative Alternative zur Hormonersatztherapie (HRT) in der Behandlung der Osteoporose diskutiert (Sehmisch et al. 2010). Die Studienlage überwiegt jedoch zu Gunsten des weiblichen Geschlechts und Studien bezüglich ihrer Wirkung auf den männlichen Knochen sind deutlich unterrepräsentiert.

Genistein

Genistein (GEN) wird oral aufgenommen, kann dann durch die intestinale Mikroflora metabolisiert und im Darm resorbiert werden. Genistein weist eine hohe Bioverfügbarkeit auf (Sfakianos et al. 1997). Die Ausscheidung erfolgt über die Niere.

Seine östrogene Wirkung entfaltet Genistein über die Bindung an die ER-Rezeptoren, verstärkt über die Bindung an den ER β (Kostelac et al. 2003).

Die Wirkung von Genistein am Tierknochen wurde in vielen Studien untersucht. An weiblichen Ratten konnte ein präventiver Effekt auf den Knochen nachgewiesen werden (Fanti et al. 1998). Ein therapeutischer Effekt konnte an weiblichen Ratten gezeigt werden, indem Genistein erst nach der Ausbildung der Osteoporose verabreicht wurde (Bitto et al. 2008).

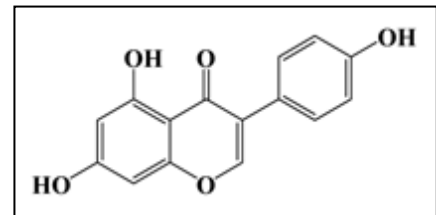


Abb. 5 Struktur von Genistein
(Quelle: Ha et al. 2010, S.629).

Eine randomisierte klinische Studie an postmenopausalen Frauen konnte einen deutlichen knochenprotektiven Effekt aufzeigen (Marini et al. 2007). Ebenfalls konnte eine präventive Wirkung an männlichen Mäusen nach Orchiektomie belegt werden (Ishimi et al. 2002).

In der Literatur geht hervor, dass Genistein eine stärkere Wirkung auf die Spongiosa zeigt als auf die kortikalen Anteile des Knochens (Mathey et al. 2004).

Es wird vermutet, dass Genistein seine knochenprotektive Wirkung über die Stimulation des Knochenaufbaus entfaltet. In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Genistein das Wachstum von Osteoblasten stimuliert und die Proliferation von Osteoklasten hemmt (Yamagishi et al. 2001, Rickard et al. 2003). Eine klinisch signifikante Wirkung auf die Mamma und den Uterus konnte nicht gezeigt werden, was auf ein erniedrigtes Nebenwirkungsprofil von Genistein schließen lässt (Marini et al. 2007). Die knochenprotektive Wirkung von Genistein kombiniert mit dem vermutlich geringeren Nebenwirkungsprofil im Vergleich zur HRT lässt Genistein zu einer neuen Therapiemöglichkeit der Osteoporose avancieren (Bitto et al. 2008).

Der therapeutische Effekt von Genistein auf den osteoporotischen Knochen männlicher Ratten wurde bisher jedoch nicht in Studien untersucht und soll daher in dieser Studie eruiert werden.

Equol

Equol (EQ) ist ein Metabolit des Phytoöstrogens Daidzain. Daidzain wird nach oraler Aufnahme von Darmbakterien wie *Streptococcus intermedius* und *Ruminococcus* zu Equol verstoffwechselt, welches dann resorbiert werden kann. Die Bioverfügbarkeit von

Equol ist abhängig von den Equol-produzierenden Darmbakterien (Setchell et al. 2002). Die Ausscheidung erfolgt, analog zu Genistein, über den Urin.

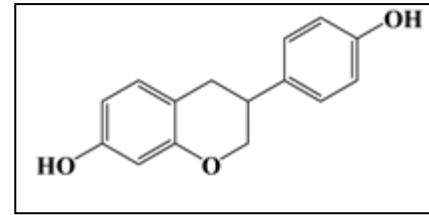


Abb. 6 Struktur von Equol
(Quelle: Ha et al. 2010, S.629).

Equol ist ein chirales Molekül, das als S- bzw. R-Enantiomer vorliegen kann. Seine östrogene

Wirkung entfaltet Equol sowohl über die Bindung an den ER α als auch über ER β , wobei die Transkriptionsaktivität nach Bindung an den ER α größer ist als bei Genistein (Kostelac et al. 2003). Da der antiresorptive Effekt des Östrogens überwiegend über ER α vermittelt wird, gilt Equol als das Phytoöstrogen mit der größeren östrogenartigen Aktivität und einer besseren Wirkung auf den osteoporotischen Knochen (Fonseca und Ward 2004).

Die Literatur über die Effekte von Equol bzw. Daidzain auf den Knochen ist weniger umfangreich. An ovariectomierten Ratten konnte eine Hemmung des Knochenverlustes durch Daidzain gezeigt werden (Picherit et al. 2000). Darüber hinaus führte die Applikation von EQ an weiblichen Tieren zu einer verbesserten Knochenqualität (Sehmisch et al. 2010). Die Forschungsgruppe um Rachon konnte hingegen keine knochenprotektive Wirkung von Equol an weiblichen Ratten nachweisen (Rachon et al. 2007).

Equol wirkt ebenfalls verstärkt auf den spongiösen Knochen. Es verhindert hier insbesondere die Abnahme der Trabekelanzahl (Mathey et al. 2004).

Um die variable Bioverfügbarkeit von Daidzain zu umgehen und äquivalente Plasmaspiegel zu gewährleisten, wurde in unserer Studie auf den Metaboliten Equol zurückgegriffen.

2.5 Ratten als Tiermodell für die Osteoporose

Wie bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, eignet sich die Sprague-Dawley-Ratte besonders gut als Tiermodell zur Untersuchung der Osteoporose (Kalu 1991). Die Verwendung von Rattentieren bietet unterschiedliche Vorteile.

Ratten sind schon mit wenigen Monaten geschlechtsreif und entwickeln nach Kastration durch Orchiektomie bzw. Ovariectomie zuverlässig innerhalb von vier Wochen eine Osteoporose (Roudebush et al. 1993). Substanzwirkungen können hervorragend durch Futterapplikation untersucht werden und darüber hinaus sind die Hormonwirkungen auf das Knochengewebe der Ratten auf den Menschen übertragbar (Frost und Jee 1992). Bei der Untersuchung der Phytoöstrogene erweist es sich als günstig, dass die Plasmakonzentrationen bei Ratten und Menschen vergleichbar sind (King et al. 1996, Xu et al. 1994).

Zur Beurteilung der Wirkung von Testsubstanzen auf den Knochen eignet sich insbesondere die Untersuchung der proximalen Metaphyse. Dieser Knochenabschnitt zeigt eine besonders starke Ausprägung der Osteoporose (Wronski et al. 1985). Darüber hinaus ist der spongiöse Knochenanteil hier besonders stark durch Östrogen reguliert (Hertrampf et al. 2006).

Besonders die histologische Untersuchung der Tibia gibt Aufschluss über die strukturellen Veränderungen sowohl der Substantia compacta als auch der Substantia spongiosa. Des Weiteren ermöglicht sie eine Beurteilung der Mikroarchitektur des Knochens.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Es wurden 150 selbstgezeugene, männliche Ratten der Gattung Sprague-Dawley (S.D.-Ratten, Winkelmann, Borcheln) für die Versuchsreihe verwendet. Zu Versuchsbeginn waren die Ratten 3 Monate alt und wogen durchschnittlich $349\text{g} \pm 19\text{g}$.

Während der Versuchsdurchführung wurden 5 Tiere gemeinsam in einem Käfig (Makrolonkäfig Typ IV, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Jeder Käfig war mit einer frischen Trinkwasserversorgung ausgestattet und hatte eine Futterschale, zu der die Tiere allzeit freien Zugang hatten. Die Beleuchtung des Raumes erfolgte in einem 12h Hell-Dunkelzyklus, in dem der Raum in der Zeit von 6-18 Uhr beleuchtet war. Die Raumtemperatur betrug durchschnittlich 23°C , die Luftfeuchtigkeit lag bei 55%.

Die Tierkäfige wurden regelmäßig von Tierpflegern gereinigt und die Versorgung der Tiere durch regelmäßige Beobachtungen sichergestellt. Der Tierversuch fand in den Tierställen des Universitätsklinikums Göttingen unter Aufsicht von Prof. Dr. Dr. K. G. Wiese und Dr. D. Seidlova-Wuttke statt. Eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig (AZ: 509.42502/01-36.03) lag vor.

3.2 Versuchsaufbau

Nach einer 3-wöchigen Eingewöhnungsphase, in der die 150 Versuchstiere unter gleichen Bedingungen gehalten und mit sojafreiem Futter gefüttert wurden, wurde die Orchiectomie (Orx) durchgeführt, um auf diese Weise die Induktion der Osteoporose einzuleiten.

Nach einem Zeitintervall von 4 Wochen, in dem bei den Tieren die Entwicklung der Osteoporose stattfand, wurden die Tiere in 5 Gruppen zu je 30 Tieren eingeteilt, von denen 4 Gruppen als Verum Dihydrotestosteron (DHT), Östrogen (E2), Genistein (GEN) oder Equol (EQ) über das Futter erhielten. Die fünfte Gruppe bekam weiterhin sojafreie Nahrung und diente der Kontrolle.

2 Wochen nach der Futterumstellung wurden jeweils 10 Tiere einer Gruppe obduziert. Die Tötung fand nach Inhalationsnarkose mittels Dekapitation statt. Bei der Obduktion wurden Blut und verschiedene Organe entnommen, präpariert und für spätere Untersuchungen konserviert. Zur histologischen Untersuchung des Knochens wurde die rechte Tibia präpariert und in Formalin aufbewahrt.

Eine zweite Obduktion erfolgte 3 Wochen nach dem Umtausch des Futters, die letzte Obduktion schloss sich insgesamt 9 Wochen nach dem Futtertausch an.

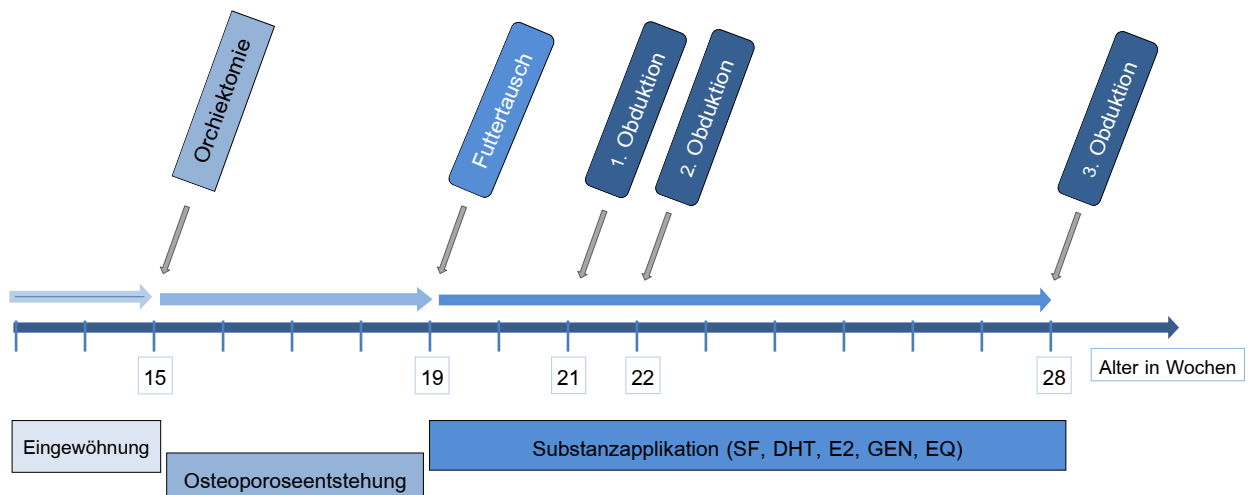


Abb. 7 Zeitlicher Versuchsaufbau: Nach der Eingewöhnungsphase wurde an allen Tieren eine Orchiektomie durchgeführt, wodurch sich innerhalb von 4 Wochen eine Osteoporose entwickelte. Anschließend erfolgte der Futtertausch, wobei die Substanzen jeweils 2, 3 oder 9 Wochen appliziert wurden, bevor die Obduktion erfolgte. Zu jedem Obduktionszeitpunkt wurden 10 Tiere einer Gruppe getötet.

3.3 Orchiektomie und Identifizierung der Tiere

Nach der 3-wöchigen Gewöhnungsphase wurde an allen 150 Versuchstieren, die nun fast 4 Monate alt waren, die Orchiektomie durchgeführt. Der Eingriff erfolgte unter einer dualen Vollnarkose. Zum einen erhielten die Tiere eine CO₂-Inhalationsnarkose und zum anderen eine intraperitoneale Injektion von Xylozin (Rompun®, Fa. Bayer, Leverkusen) und Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden) im Verhältnis 4:5. Xylozin wurde in einer Dosis von 2,5mg/Tier, entsprechend 10mg/Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG), verabreicht, während vom Ketamin 11mg/Tier, entsprechend 45mg/kg KG, appliziert wurden. Zum intraoperativen Schutz vor Austrocknung der Augen wurde den Tieren ein Feuchtigkeitsgel (Thilo-Tears®, Fa. Alcon) verabreicht.

Nach Lagerung der Tiere im sterilen Operationsgebiet wurden die Hoden durch Palpation der Bauchhöhle aufgesucht. Nach medialer Schnittinzision der Skrotalhaut wurde das viszerale Peritoneum durchtrennt, um den Hoden zu präparieren. Es erfolgte die Darstellung des Hodens und das Aufsuchen der Gefäßversorgung. Der Ductus epididymis wurde mit den versorgenden Gefäßen durch Vicryl-Fäden ligiert. Nach Unterbindung der Blutversorgung wurde der Hoden entfernt. Anschließend wurde das Operationsfeld auf Blutungsfreiheit kontrolliert. Dieses Verfahren wurde auf der kontralateralen Seite wiederholt, woran sich der Verschluss der Skrotalhaut anschloss.

Die Narkose wurde durch die intraperitoneale Injektion von 0,3–0,5 ml einer 10%igen Antipamezolhydrochlorid-Lösung mit NaCl beendet (Antisedan®, Pfizer, Freiburg). Insgesamt betrug die Narkosedauer durchschnittlich 10-15 Minuten. Während der Aufwachphase standen die Tiere unter ständiger Beobachtung. Zur postoperativen

Dehydratationsprophylaxe erhielten die Tiere 5ml einer isotonen NaCl-Lösung (Fa. Braun, Melsungen) subkutan.

Jedem Versuchstier wurde unter Narkose ein Transponder in das subkutane Fettgewebe des Nackens implantiert. Auf diese Weise war jederzeit eine Identifizierung der einzelnen Tiere möglich, indem mittels eines tragbaren Transponder-Lesegerätes die Transpondernummer ausgelesen wurde. Es kam das Transponder-UNO Micro-ID-System mit ISO Transponder der Länge 12mm zur Anwendung (Gesreder II Ge S008: ISO kompatibler Taschenleser). Jedes Tier erhielt so eine Identifikationsnummer, unter der alle erhobenen Daten des Experiments festgehalten wurden.

3.4 Tierfutter

Alle Versuchsratten erhielten bis zum Futtertausch soja- und testsubstanzfreies Futter (V 1354, ssniff R-Z, 10mm, phytoöstrogenarm, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Nach der Gruppenaufteilung erhielt eine Gruppe weiterhin das soja- und testsubstanzfreie Futter, die anderen Gruppen erhielten spezielle Futtermischungen mit einem der folgenden Zusätze:

- 1mg/kg Dihydrotestosteron (DHT)
- 10mg/kg Estradiolbenzoat (E2)
- 1g/kg Genistein (GEN)
- 400mg/kg Equol (EQ).



Abb. 8 Futterpellets
(Quelle : www.schweineban.de, 2010)

Die Tiere hatten stets freien Zugang zum Futter, auf ein ausreichendes Angebot wurde geachtet. Einmal wöchentlich fand ein Futterwiegen und Auffüllen des Tierfutters statt. Hierzu wurden zum Schutz vor Inhalation und perkutaner Absorption Latex-Einweghandschuhe, Schutzkittel sowie Mund- und Nasenmasken getragen. Die geöffneten Futtersäcke wurden bei Raumtemperatur gelagert, während verschlossene Futtersäcke bei -20° Grad aufbewahrt wurden.

3.5 Herstellung der Hartschnittpräparate und Goldner-Färbung

Die Rattentibiae wurden zu Kunststoffblöcken weiterverarbeitet, um hieraus Knochenfeinschnitte zur mikroskopischen Auswertung zu gewinnen.

Zur Herstellung der Hartschnittpräparate wurden die Rattentibiae zunächst mittels 4%iger Formalinlösung für eine Dauer von 1 Woche fixiert, um die Auto- bzw. Heterolyse zu unterbinden.

Anschließend erfolgten die Dehydratation mit einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur, die Behandlung mit Xylol zur Entfettung der Gewebeproben sowie die Behandlung mit dem Einbettmedium (s. Anhang Tab. A-1). Zur Einbettung wurde ein Kunststoff-Kit auf Methylmethacrylat-Basis (Technovit 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) verwendet. Hierzu wurden die Rattentibiae zunächst wiederholt mit einer



Abb. 9 Kunststoffblöcke mit eingebettetem Kniegelenk der S.D. Ratte.

Präinfusionslösung getränkt, um zu gewährleisten, dass die Präparate vollständig vom Methylmethacrylat durchzogen waren. Zur Herstellung der eigentlichen Kunststoffblöcke wurden Einbettformen zu $\frac{3}{4}$ mit Methylmethacrylat gefüllt, die Präparate hineingelegt, ausgerichtet und anschließend für 10 Minuten im Exsikkator bei 200mbar evakuiert. Der kaltpolymerisierende Kunststoff verkettet sich im Vakuum

bei 30°C. Im Anschluss wurden die Formen luftdicht verschlossen und im Tiefkühlschrank bei -8°C für 2 Tage aufbewahrt.

Nach der Aushärtung wurden die eingebetteten Tibiae mittels eines Rotationstischmikrotoms (Leica RM 2165, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) in 7µm dicke Längsschnitte geschnitten, auf Objektträger aufgezogen, mit 96%igen Alkohol gestreckt, mit PVC-Folie abgedeckt und über Nacht in einer Schnittpresse bei 50°C getrocknet.

Zur besseren Differenzierung der histologischen Strukturen wurden die Schnitte mit der Goldner-Färbung koloriert. Durch diese spezielle Färbemethode werden Erythrozyten leuchtend rot, Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma orange bis rot, Bindegewebe grün und Muskelgewebe blassrot farblich differenzierbar. Sie eignet sich daher insbesondere zum farblichen Hervorheben der kollagenhaltigen Knochensubstanz.

Zur Extraktion des Kunststoffes aus dem Gewebe

wurden die Schnitte zunächst 3x 20min mit Xylol, 2x 15min mit 2-Methoxyethylacetat und 2x 5min mit Aceton behandelt und anschließend 2x 2min mit Aqua dest. gespült. Der eigentliche Prozess der Färbung vollzog sich nach den Schritten, die der Tabelle (Tab. A-2) im Anhang zu entnehmen sind.



Abb. 10 Sagittaler Feinschnitt des Kniegelenks; links: Tibia- u. Femurlängsschnitt der S.D.-Ratte aufgezogen auf einem Objektträger, rechts: Färbung des Längsschnitts nach Goldner.

3.6 Versuchsauswertung

Die Versuchsauswertung erfolgte mit einem hochauflösenden Mikroskop (Axioskop 2 plus mit Axio Cam MRc5, Zeiss GmbH, Jena), welches eine digitale Aufnahme der Bildausschnitte ermöglichte. Die Bildausmessung und -verarbeitung wurde mit der vom Hersteller gelieferten Software vorgenommen (Axio Vision 4.8, Zeiss GmbH).

Es wurde von jedem Schnitt sowohl eine Übersichtsaufnahme in einer 1,25fachen Vergrößerung erstellt, an dem die Auswertung der Kortikalis erfolgte, sowie jeweils zwei Aufnahmen in einer 10fachen Vergrößerung, die zur Beurteilung des trabekulären Knochenanteils herangezogen wurden. Um eine Vergleichbarkeit der trabekulären Parameter zu gewährleisten, wurden beide 10fachen Vergrößerungen in einem Abstand von 500µm von der Wachstumsfuge der Tibia aufgenommen.

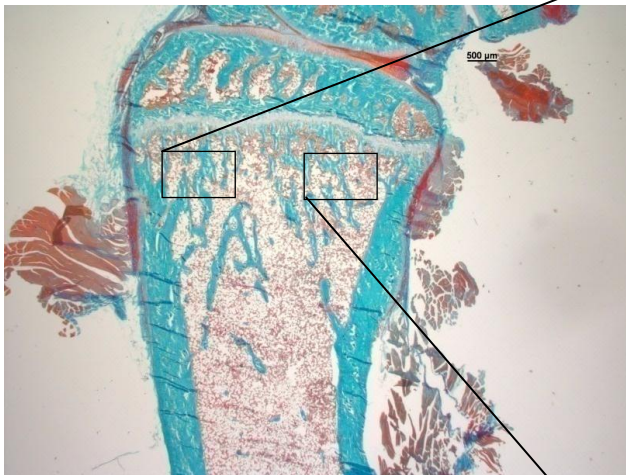


Abb. 11 Rattentibia, Längsschnitt, 1,25x Vergrößerung

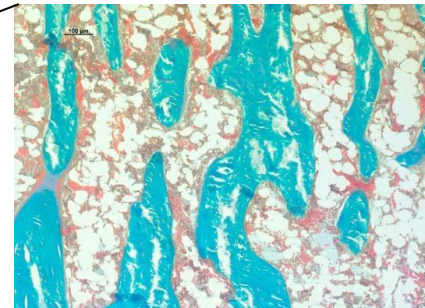


Abb. 11a Spongiosa der Rattentibia in 10x Vergrößerung, 500µm distal der Wachstumsfuge, linksseitig

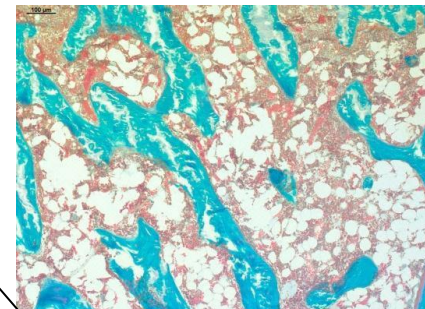


Abb. 11b Spongiosa der Rattentibia in 10x Vergrößerung, 500µm distal der Wachstumsfuge, rechtsseitig

3.7 Messgrößen für die Kortikalis und Spongiosa

Zur Beurteilung der Wirkung auf die Knochenkompakta wurde die Kortikalisdicke herangezogen. Zur Messung der Kortikalisdicke wurde die Software Sigma Scan Pro (Sigma Scan Pro 5.0, SPSS Inc., Chicago) verwendet. Es erfolgten in jedem Schnitt je 30 Messungen der Kortikalisdicke auf jeder Kortikalisseite, wovon 20 Messungen im metaphysären Bereich der Kortikalis erfolgten und weitere 10 Messungen im Bereich der Diaphyse. Es erfolgte eine Unterscheidung zwischen der Kortikalis im Bereich der

Diaphyse und der Metaphyse, da die Kortikalis im diaphysären Bereich deutlich dicker ist als in der Metaphyse, wo die Spongiosa nur von einer dünnen Kortikalis umgeben ist.

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungen auf die Spongiosa zu untersuchen, wurden am tibialen Knochen der Ratte die Trabekelfläche (TbA), die Trabekelanzahl (TbN) und die Trabekelgröße in der Metaphyse beurteilt. Zur Charakterisierung der Formveränderungen der Spongiosabälkchen wurden darüber hinaus die Kompaktheit der Bälkchen und der Feretdurchmesser der Trabekel bestimmt. Die Messungen erfolgten an den Bildausschnitten in 10facher Vergrößerung und wurden mit Hilfe der Software Sigma Scan Pro vorgenommen.

Das Programm Sigma Scan Pro ermöglichte eine Markierung unterschiedlicher Farbbereiche, so dass es gelang die knöchernen Strukturen, die durch die Goldner-Färbung grünlich hervorgehoben wurden, mit einem Farblayer zu belegen und daraus die exakten Trabekelflächen zu berechnen. Nachfolgende Abbildung zeigt die farbliche Markierung der Trabekel in der Sigma Scan Pro-Software mit einem blauen Layer.

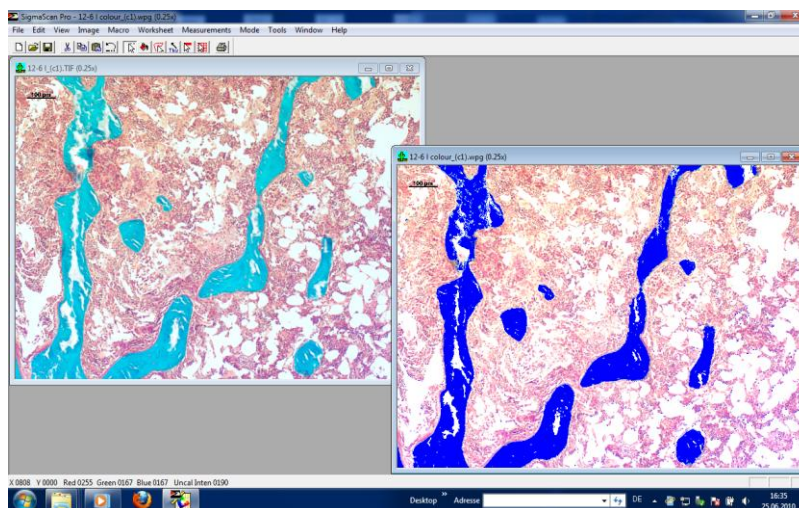


Abb. 12 Darstellung aus der Sigma Scan Pro-Software: Links ist eine Aufnahme der Knochenspongiosa in 10x Vergrößerung dargestellt, in der die trabekulären Strukturen grünlich zur Darstellung kommen und in dem rechten Fenster mit einem blauen Overlay markiert werden konnten.

Die Trabekelfläche wurde prozentual zur Bildfläche errechnet, wobei ein Bild in der 10fachen Vergrößerung eine Gesamtfläche von 1,42mm² hatte. Die gemessene Trabekelanzahl wurde in der Auswertung ebenfalls auf die Bildfläche bezogen. Darüber hinaus wurden die prozentualen Trabekelflächen auf 100g Körpergewicht der jeweiligen Substanzgruppe bezogen, um die Gewichtsunterschiede der Ratten besser berücksichtigen zu können. Die mediane Trabekelgröße wurde ebenfalls ermittelt. Sie gibt Aufschluss über die Größe der einzelnen Trabekel.

Zur Charakterisierung der Formveränderung der Spongiosabälkchen wurden der Feretdurchmesser (feretdiameter) und die Kompaktheit (compactness) der Trabekel bestimmt.

Beim Feretdurchmesser wird der theoretische Durchmesser eines Kreises errechnet, der den gleichen Flächeninhalt wie das gemessene Objekt aufweist. Das heißt der Feretdurchmesser gibt an, wie groß der Durchmesser eines Kreises wäre, wenn der Kreis die gleiche Fläche aufweisen würde, wie ein betrachtetes Knochenbälkchen in der Spongiosa. Der Feretdurchmesser wird in Mikrometer angegeben und lässt Rückschlüsse auf die Größe der Trabekel zu. Je größer der Feretdurchmesser ist, desto größer sind die Bälkchen in ihrer Fläche. Rückschlüsse auf den Verzweigungsgrad der Trabekel können mit dem Feretdurchmesser nicht gezogen werden. Hierzu kann man die Messgröße der Kompaktheit heranziehen.

Die Kompaktheit beschreibt, wie kompakt ein Objekt ist und stellt eine dimensionslose Größe dar. Definiert wird sie durch das Verhältnis des quadrierten Umfangs zur Fläche eines Objekts. Die Formel lautet: $C = U^2/A$ wobei C die Kompaktheit, U der Umfang und A die Fläche des Objekts beschreibt. Sie erreicht ihr Minimum in einem kreisförmigen Objekt und strebt für verzweigte Objekte gegen Unendlich. Ein Kreis besitzt eine Kompaktheit von 4π entsprechend 12,57.

$$C = \frac{U^2}{A} = \frac{(2\pi r)^2}{\pi r^2} = \frac{4\pi^2 r^2}{\pi r^2} = 4\pi$$

Mit Hilfe der Kompaktheit können Veränderungen in der Verzweigung der Spongiosabälkchen rechnerisch ermittelt werden. Je mehr Verzweigungen ein Bälkchen aufweist, desto größer ist sein Umfang bei konstanter Fläche und umso größer seine Kompaktheit. Bei einer Rarefizierung der Verzweigung nimmt der Umfang der Bälkchen im Verhältnis zu ihrem Flächeninhalt ab und die Kompaktheit strebt gegen die Form eines Kreises, also gegen den Wert 12,57.

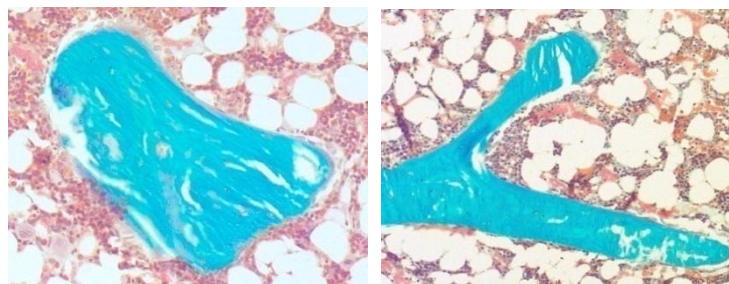


Abb. 13 Unterschiedliche Trabekelformen; links: ein rundliches Knochenbälkchen mit einer Kompaktheit von 261 und einem Feretdurchmesser von 450 μm ; rechts: ein verzweigtes Knochenbälkchen mit einer Kompaktheit von 981 und einem Feretdurchmesser von 487 μm .

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Sigma STAT und Sigma PLOT (SPSS Inc., Chicago). Es wurden alle Daten als Messreihen zu Spalten erfasst und bei Normalverteilung als Mittelwerte \pm Standardabweichung bzw. Standardfehler wiedergegeben. Nicht normalverteilte Werte wurden als Median und 25% bzw. 95% Perzentile dargestellt. Die Signifikanztestung wurde mit der Varianzanalyse und dem Holm-Sidak-Test bei normalverteilten Werten vorgenommen. Nicht parametrische Daten wurden entsprechend mit der ANOVA der Ränge und dem Dunn-Test zum Gruppenvergleich ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Futteraufnahme und Körpergewicht

Die Tiere der unterschiedlichen Gruppen nahmen zwischen 4,34-4,85g Futter pro 100g Körpergewicht (KG) pro Tag (d) zu sich. Wobei die E2-Gruppe die niedrigste Futteraufnahme verzeichnete. Die DHT-, GEN- und EQ-Gruppen hingegen nahmen deutlich mehr Futter auf als die SF-Kontrollgruppe.

Die mittlere Substanzaufnahme pro 100g KG/d lag zwischen 43,41µg und 4,85mg. Der SF-Kontrollgruppe wurden keine Testsubstanzen zugeführt.

Tab. 1 Mittlere Futteraufnahme in Gramm (g) und mittlere Substanzaufnahme in Milligramm (mg) bzw. Mikrogramm (µg) pro 100g Körpergewicht (KG) pro Tag (d) für die entsprechenden Gruppen.

Tiergruppe	Mittlere Futteraufnahme pro 100g KG/d	Mittlere Substanzaufnahme pro 100g KG/d
SF	4,59 g	0 mg
DHT	4,84 g	4,84 mg
E2	4,34 g	43,41 µg
GEN	4,85 g	4,85 mg
EQ	4,84 g	1,93 mg

Vor der Orchiektomie hatten alle Tiere ein durchschnittliches Körpergewicht von 349g ± 19g, das während des Versuchs in allen Gruppen zunahm. Die E2-Gruppe zeigte nach 2- 3- als auch 9-wöchiger Substanzapplikation ein deutlich niedrigeres Körpergewicht sowohl gegenüber der SF-Kontrollgruppe als auch gegenüber den anderen Gruppen.

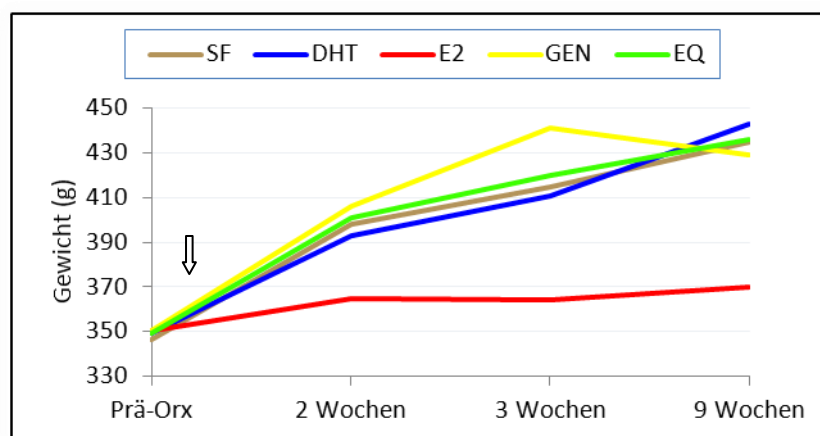


Abb. 14 Mittleres Körpergewicht (g) der S.D.-Ratten vor der Orchiektomie (Orx) und nach 2-, 3- und 9-wöchiger Applikation von DHT, E2, GEN und EQ sowie dem SF-Futter; der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Orx.

4.2 Effekte auf die Kortikalis

Effekte auf die Kortikalis der Diaphyse

Die Kortikalisdicke im Bereich der Diaphyse nahm in allen Testgruppen im Laufe der 9-wöchigen Versuchsreihe ab. Die geringste Abnahme der Kortikalisdicke zeigte sich in den Gruppen GEN und EQ.

Nach 9-wöchiger Applikation der Testsubstanzen war die Kortikalisdicke in allen Testgruppen größer als in der SF-Kontrollgruppe, wobei die der DHT-, E2- und EQ-Gruppe signifikant größer waren. Nach 9 Wochen war die Kortikalis der DHT-Gruppe um 8,2%, der E2-Gruppe um 4,0% und der EQ-Gruppe um 4,0% dicker als die der SF-Referenzgruppe. Die GEN-Gruppe hingegen hatte nur eine um 2,2% dickere Kortikalis.

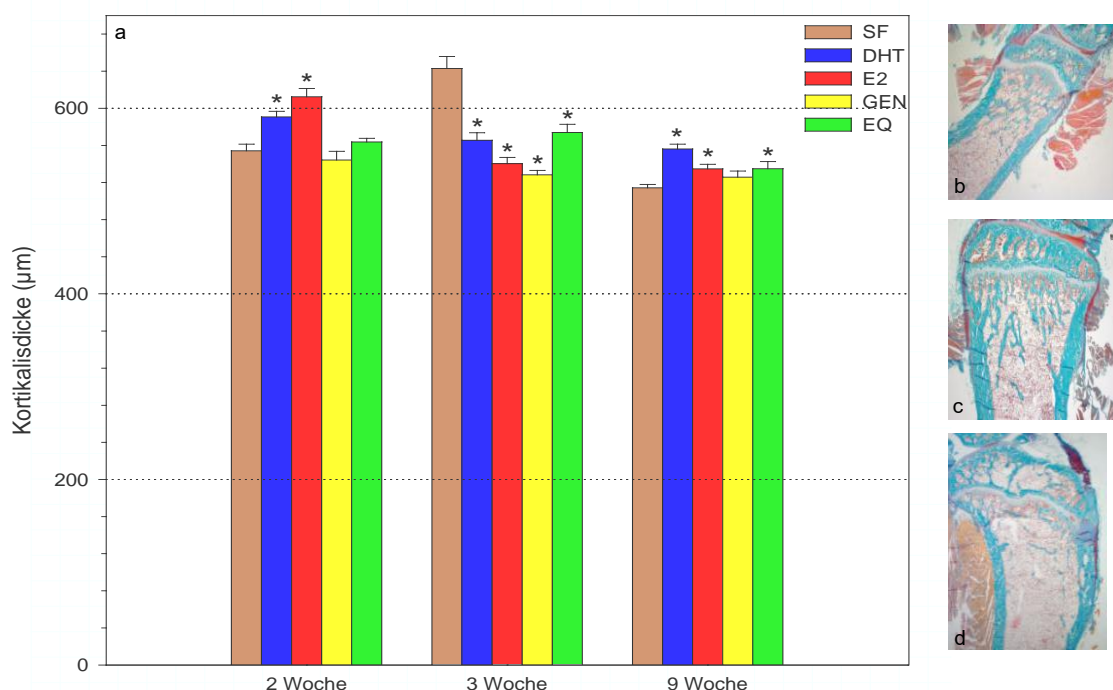


Abb. 15 Kortikalisdicke der Diaphyse (a) nach 2-, 3- und 9-wöchiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe; * $p \leq 0,05$ (ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Holm-Sidak); $102 \leq n \leq 362$. Die rechte Bildreihe zeigt Tibialängsschnitte in 1,25x Vergrößerung der SF-Kontrollgruppe (b), der DHT-Gruppe (c) und der E2-Gruppe (d).

Effekte auf die Kortikalis der Metaphyse

Die Kortikalisdicke der Metaphyse war in allen Testgruppen zu jedem Versuchszeitpunkt stets dünner als die der Diaphyse (siehe Abb. 16).

Während die Dicke der metaphysären Kortikalis über den Versuchszeitraum in der SF-Kontrollgruppe, der DHT- und der E2-Gruppe abnahm, konnte in der GEN- und EQ-Gruppe eine Zunahme der Kortikalisdicke verzeichnet werden.

Nach 9-wöchiger Applikation der Testsubstanzen zeigten GEN und EQ signifikant größere Kortikalisdicken im Vergleich zur SF-Kontrollgruppe, wobei die Zunahme bei GEN (+10,1%) größer war als bei EQ (+7,0%). Die Kortikalisdicken der DHT- und E2-Gruppe lagen nach 9 Wochen nicht signifikant unterhalb der der SF-Kontrollgruppe (DHT: -1,7%, E2 -0,8%).

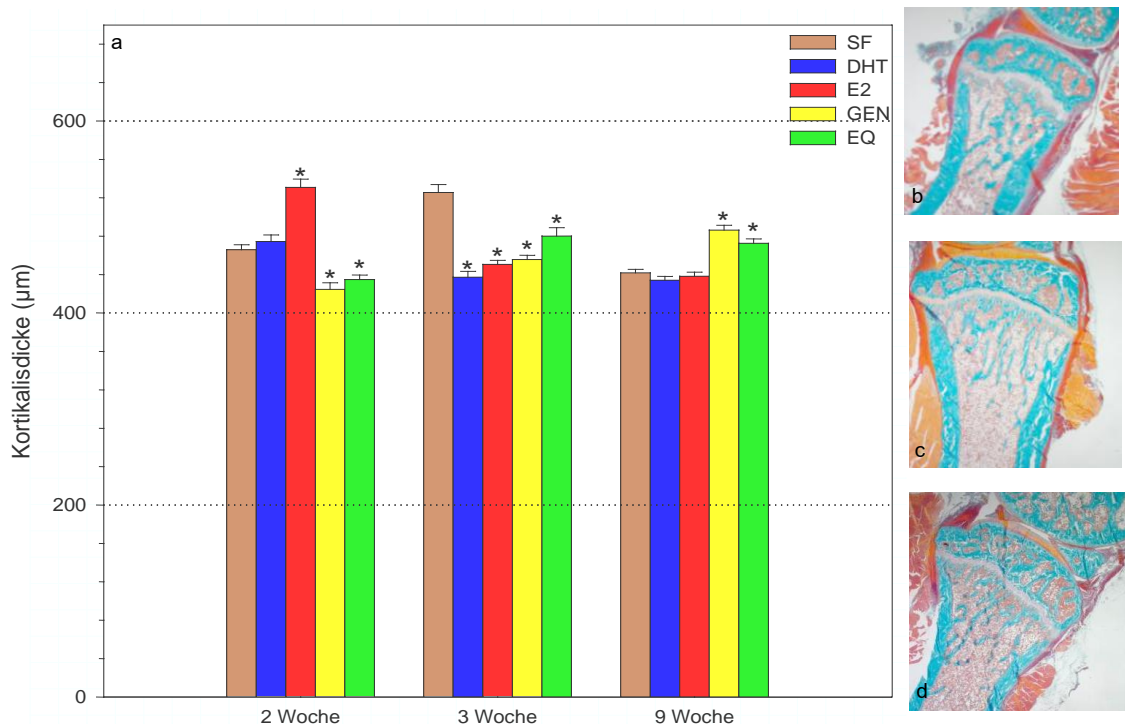


Abb. 16 Kortikalisdicke der Metaphyse (a) nach 2-, 3- und 9-wöchiger Substanzapplikation der DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie der SF-Gruppe; * $p \leq 0,05$ (ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Holm-Sidak); $252 \leq n \leq 842$. Die Bildreihe rechts zeigt Tibialängsschnitte in 1,25x Vergrößerung der SF-Kontrollgruppe (b), der DHT-Gruppe (c) und der E2-Gruppe (d).

4.3 Effekte auf die Spongiosa

Effekte auf die prozentuale Trabekelfläche und die Trabekelanzahl

Die prozentuale Trabekelfläche (%TbA) (siehe Abb. 17) nahm in allen Gruppen, mit Ausnahme der GEN-Gruppe, während der 9-wöchigen Substanzapplikation zu. Die stärkste Zunahme der Trabekelfläche war in der DHT-Gruppe zu verzeichnen.

Nach 9-wöchiger Applikation der Testsubstanzen zeigten sich die prozentualen Trabekelflächen der DHT-Gruppe und der E2-Gruppe höher als die der SF-Referenzgruppe (DHT +12,9%, E2 + 4,4%), während die Gruppen der Phytoöstrogene deutlich unterhalb der SF-Referenzgruppe lagen (GEN -31,9%, EQ - 11,0%).

Die Trabekelzahl (TbN) verhielt sich über die Versuchsdauer in den einzelnen Gruppen unterschiedlich. Die SF-Gruppe zeigte den deutlichsten Verlust. Die Trabekelanzahl der Sexualhormone blieb nahezu konstant über den 9-wöchigen Versuchsablauf, während die der Phytoöstrogene deutlich abnahm.

Nach 9-wöchiger Applikation lag die Trabekelanzahl der Phytoöstrogen-Gruppen deutlich unterhalb der SF-Referenzgruppe (GEN: - 24,8%, EQ:-17,5%), während die DHT-Gruppe und die E2-Gruppe nur leicht verminderte Trabekelzahlen zeigte (DHT: -0,8%, E2: -4,0%).

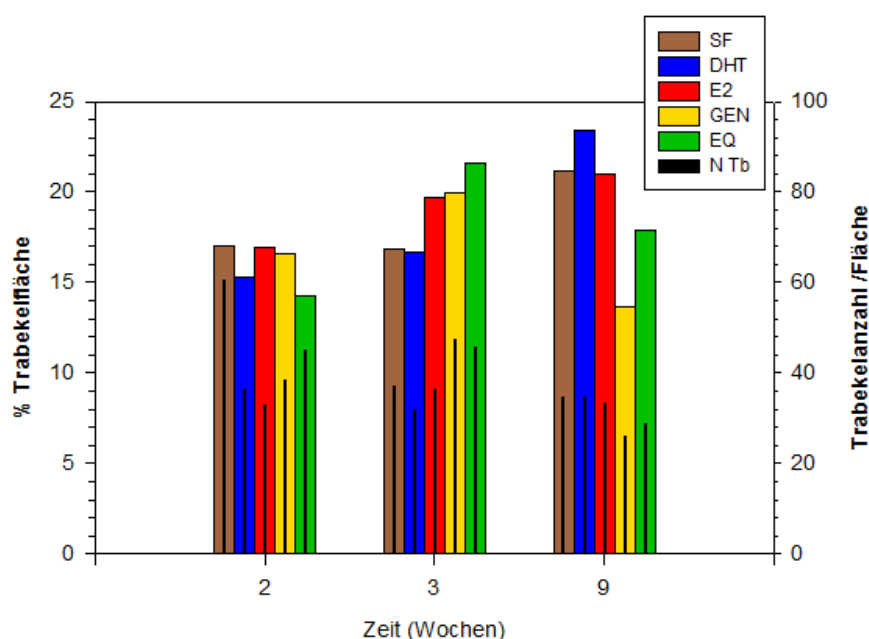


Abb. 17 Darstellung der prozentualen Trabekelfläche und der Trabekelanzahl pro Fläche für die DHT-, E2-, GEN-, EQ- sowie SF-Gruppe nach 2-, 3- und 9-wöchiger Substanzapplikation; Farbige Balken: prozentuale Trabekelfläche bezogen auf die Gesamtbildfläche einer 10x Vergrößerung (1,42mm²); schwarze Balken: Trabekelanzahl pro Gesamtbildfläche einer 10x Vergrößerung (1,42mm²).

Die Veränderungen der Trabekelflächen bezogen auf 100g Körpergewicht (KG) (siehe Abb. 18) verhalten sich ähnlich der prozentualen Trabekelflächen, berücksichtigen jedoch das signifikant niedrigere Gewicht der E2-Gruppe. In allen Gruppen, mit Ausnahme der GEN-Gruppe, nahm die Trabekelfläche bezogen auf das Körpergewicht zu. Die stärkste Zunahme erfuhr die DHT-Gruppe, gefolgt von der E2-Gruppe. Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war die prozentuale Trabekelfläche pro 100g KG in der E2-Gruppe (+22,7%) und der DHT-Gruppe (+11%) deutlich größer als in der SF-Kontrollgruppe, während die Phytoöstrogene deutlich unterhalb der SF-Kontrollgruppe lagen (GEN: -30,9%; EQ: -11,3%).

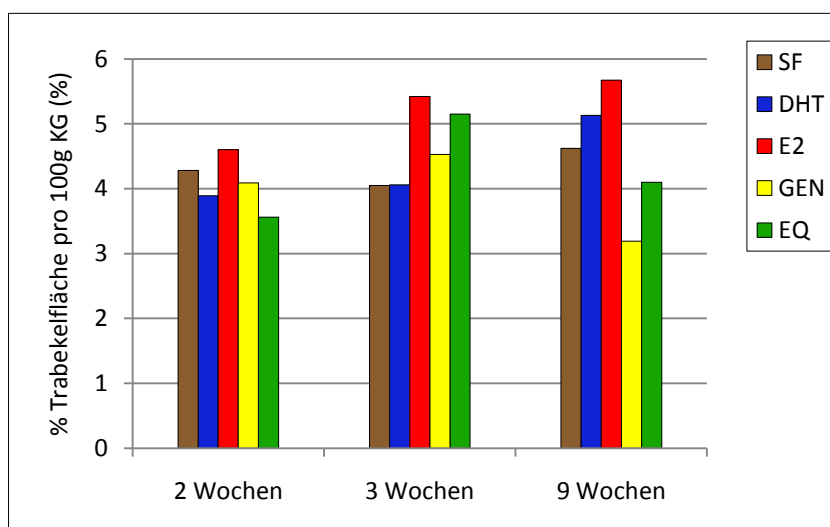


Abb. 18 Die prozentuale Trabekelfläche pro 100g Körpergewicht (KG) für die SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe nach 2-, 3- und 9-wöchiger Substanzapplikation.

Effekte auf die Trabekelstruktureigenschaften

Die mediane Trabekelgröße gibt Aufschluss darüber, wie groß die einzelnen Spongiosabälkchen sind. Die mediane Fläche eines Trabekels nahm während des Versuchs über 9 Wochen sowohl in den Gruppen der Sexualhormone als auch in den Phytoöstrogen-Gruppen ab. Der stärkste Verlust war in der DHT-Gruppe zu verzeichnen (siehe Abb. 19).

Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war die mediane Trabekelgröße der DHT-Gruppe kleiner, die der anderen Gruppen größer im Vergleich zur SF-Referenzgruppe, wobei die Gruppen E2 und GEN signifikant erhöht waren (DHT: -14,7%, E2: +88,8%, GEN: +66,7%, EQ: +5,7%).

Der Feretdurchmesser, der die Fläche eines Trabekels als Kreisfläche darstellt und dessen Durchmesser angibt, verhielt sich wie die mediane Trabekelgröße und nahm ebenfalls während des 9-wöchigen Versuchsablaufs in allen Gruppen ab. Die DHT-Gruppe verzeichnete hierbei die stärkste Abnahme.

Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war der Feretdurchmesser in den Gruppen E2, GEN und EQ erhöht, während die DHT-Gruppe erniedrigte Feretdurchmesser, bezogen auf die SF-Kontrollgruppe, zeigte. Signifikante Unterschiede stellten sich nur in den Gruppen E2 und GEN dar (DHT: -7,6%, E2: +37,3%, GEN: +29,1%, EQ +2,8%).

Die Kompaktheit, ein Parameter der Trabekelverzweigung, nahm in der SF-Gruppe während der 9 Wochen ab. Ebenso verhielt es sich mit den Sexualhormongruppen DHT und E2. Die Kompaktheit der Gruppen GEN und EQ nahmen jedoch deutlich zu. Die SF-

Gruppe zeigte die stärkste Abnahme, während die geringste in der DHT-Gruppe zu verzeichnen war.

Nach 9-wöchiger Substanzapplikation zeigten die DHT-, GEN- und EQ-Gruppen eine höhere Kompaktheit bezüglich der SF-Referenzgruppe, während die Kompaktheit der E2-Gruppe erniedrigt war (DHT: +5,9%, E2: -15,9%, GEN: +27,5%, EQ: +36,7%).

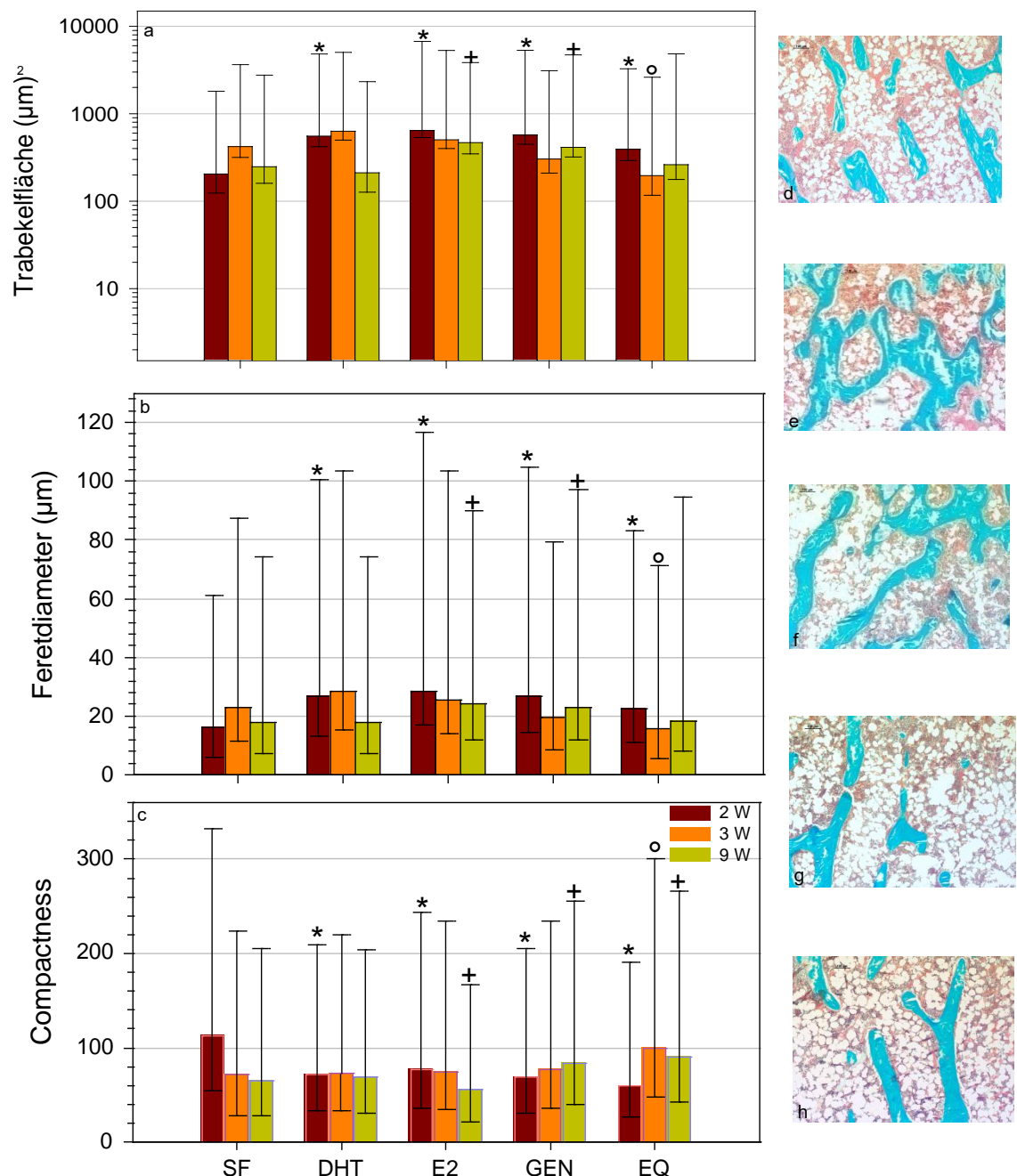


Abb. 19 Median der Trabekelgröße (a), des Feretdurchmessers (b) und der Compactness (c) der Trabekel der SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe nach 2-, 3- und 9-wöchiger (2W, 3W u. 9W) Substanzapplikation, sowie die 25%- und 75%-Perzentilen; * $p \leq 0,05$ (ANOVA und multipler Vergleich gegen die SF-Referenzgruppe einer jeden Obduktionsgruppe nach Dunn); $401 \leq n \leq 1426$. Die rechte Bildreihe zeigt Ausschnitte aus der Spongiosa der Metaphyse in 10x Vergrößerung von Tieren der SF-Gruppe (d), der DHT-Gruppe (e), der E2-Gruppe (f), der GEN-Gruppe (g) und der EQ-Gruppe (h).

Zusammenfassung der Wirkung der Testsubstanzen auf die Spongiosa

Tab. 2 Überblick über die Veränderungen der prozentualen Trabekelfläche pro 100g KG (%TbA/100g KG), Trabekelanzahl (TbN), mediane Trabekelfläche bzw. -größe (mediane TbA), Feretdurchmesser (Feret) und die Kompaktheit (Kompakt) für die SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe:

^(a) im zeitlichen Verlauf von 2 zu 9 Wochen und ^(b) nach 9 wöchiger Substanzapplikation bezogen auf die SF-Kontrollgruppen (↓=Abnahme, ↑ = Zunahme, ⇔ = nahezu unverändert)

	SF ^(a)	DHT ^(a)	DHT ^(b)	E2 ^(a)	E2 ^(b)	GEN ^(a)	GEN ^(b)	EQ ^(a)	EQ ^(b)
%TbA/ 100gKG	↑	↑	↑ (+11,0%)	↑	↑ (+22,7%)	↓	(-30,9%) ↓	↑	(-11,3%) ↓
TbN	↓	⇔	(-0,8%) ⇔	⇔	(-4,0%) ↓	↓	(-24,8%) ↓	↓	(-17,5%) ↓
Mediane TbA	↑	↓	(-14,7%) ↓	↓	↑ (+88,8%)	↓	↑ (+66,7%)	↓	↑ (+5,7%)
Feret	↑	↓	(-7,6%) ↓	↓	↑ (+37,3%)	↓	↑ (+29,1%)	↓	↑ (+2,8%)
Kompakt	↓	⇔	↑ (+5,9%)	↓	(-15,9%) ↓	↑	↑ (+27,5%)	↑	↑ (+36,7%)

Lesehilfe: [SF^(a), %TbA]: Die prozentuale Trabekelfläche der SF-Kontrollgruppe nahm während des 9-wöchigen Versuchszeitraum zu; [DHT^(a), %TbA]: Die prozentuale Trabekelfläche der DHT-Gruppe nahm während des 9-wöchigen Versuchszeitraums zu; [DHT^(b), %TbA]: Nach 9-wöchiger Substanzapplikation hatte DHT eine 12,9% höhere prozentuale Trabekelfläche als die SF-Kontrollgruppe.

5. Diskussion

5.1 Futteraufnahme und Körpergewicht

Zur Untersuchung der Wirkung der Sexualhormone, DHT und E2, sowie der Phytoöstrogene, GEN und EQ, auf den osteoporotischen Knochen, wurden die Substanzen der Tiernahrung zugefügt.

Durch das Wiegen der aufgenommenen Futtermenge bzw. des Körpergewichts konnte die mittlere Testsubstanzaufnahme (mg/100g KG) berechnet werden, die in allen Gruppen in einem anerkannten Wirkungsbereich lag (Mathey et al. 2004, Vandenput et al. 2002).

Das Körpergewicht der Tiere nahm während der Versuchsdauer fortwährend zu. Diese Gewichtszunahme ist zum einen durch die Größenzunahme der Tiere und zum anderen durch die Orchiektomie zu erklären. Entsprechend ihrer altersüblichen Gewichtszunahme nehmen männliche Sprague-Dawley-Ratten von der 12. Woche (Beginn der Studie) bis zur 28. Woche (3. Obduktion) im Durchschnitt 135g an Körpergewicht zu (Abb. 18). Außerdem führt die Resektion der Testis selbst zu einer Zunahme des Körpergewichts (Schot und Schuurs 1990).

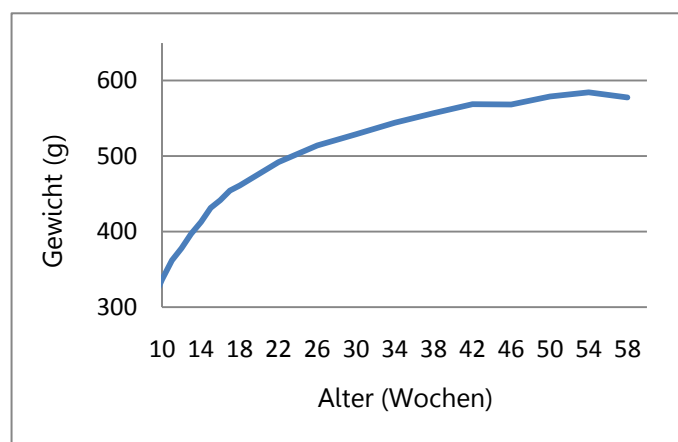


Abb. 20 Gewichtszunahme (g) der S.D.-Ratten mit zunehmenden Alter (Wochen) laut eines Herstellers Taconic, Inc., USA (Quelle: www.taconic.com, 2010)

Die Gewichtszunahmen in den Behandlungsgruppen DHT, GEN und EQ sowie in der SF-Kontrollgruppe waren in ihrem Verlauf nahezu identisch, während sich die Gewichtsveränderungen in der E2-Gruppe auf einem niedrigeren Niveau gegenüber der SF-Kontrollgruppe bewegten.

Als Erklärung für das reduzierte Gewicht dieser Gruppe lässt sich die appetitmindernde Wirkung des Östrogens heranziehen (Wade 1972), welche in unserer Studie durch die

verminderte Futteraufnahme der E2-Gruppe bezüglich der SF-Gruppe bestätigt werden kann.

Im Gegensatz zur östrogen-bedingten Reduktion der Futteraufnahme war in der DHT-Gruppe eine erhöhte Nahrungsaufnahme zu verzeichnen, die nach 9-wöchiger Applikation zu deutlich schwereren Tieren in der DHT-Gruppe führte. Dies bestätigt, dass DHT zu einer erhöhten Futteraufnahme und dadurch zu einer Zunahme des Körpergewichts führt (Gentry und Wade 1976).

Das Körpergewicht der GEN- und EQ-Gruppe war auf einem annähernd hohem Niveau mit der DHT-Gruppe, denn Isoflavone reduzieren zwar bei weiblichen, nicht jedoch bei männlichen Ratten den Appetit und die Futteraufnahme (Kishida et al. 2008).

Da die SF-Kontrollgruppe ebenfalls an Körpergewicht zunahm, muss die Veränderung des Körpergewichts hauptsächlich auf die Größenzunahme der Tiere und den Effekt der Orchiektomie zurückgeführt werden. Lediglich der Gewichtsunterschied der E2-Gruppe war deutlich abweichend und daher vermutlich stark östrogenvermittelt.

5.2 Veränderungen des Knochens nach Orchiektomie in der SF-Gruppe

Die männliche, orx-Ratte ist ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Osteoporose (Roudebush et al. 1993, Frost und Jee 1992). Die Orchiektomie führt zu einem künstlich hervorgerufenen Androgen-Defizit, welches die Osteoporose induziert. Der Knochenverlust betrifft den kortikalen, überwiegend jedoch den trabekulären Knochen (Tuukkanen et al. 1994).

Unsere Ergebnisse zeigen in der SF, orx-Kontrollgruppe über den 9-wöchigen Versuchszeitraum einen Verlust an Knochensubstanz sowohl im diaphysären als auch im metaphysären Bereich der Kortikalis, wodurch ein orchiektomie-induzierter, kortikaler Knochenverlust durch unsere Studie bestätigt werden kann.

Im Gegensatz zu anderen Studien (Wakley et al. 1991, Tuukkanen et al. 1994, Vandenput et al. 2002) konnte in unserer SF-Kontrollgruppe kein absoluter Verlust an trabekulären Knochen beobachtet werden. Die prozentuale Trabekelfläche nahm während des Versuchs, wenn auch nur geringfügig, zu.

Die erhobenen Parameter zur Beurteilung der mikrostrukturellen Veränderungen der Spongiosa zeigten jedoch in der SF-Kontrollgruppe eine deutliche Abnahme der Trabekelanzahl (TbN) und deren Kompaktheit, während die Fläche eines einzelnen Trabekels an Größe zunahm. Insgesamt belegen der starke Verlust der Trabekelanzahl und der starke Verlust der Trabekelverzweigungen (Kompaktheit) die Ausbildung des osteoporotischen Knochens. Die Zunahme der prozentualen Trabekelfläche resultiert aus der zugenommenen medianen Trabekelfläche der einzelnen Trabekel bzw. des Feretdurchmessers.

Die unerwartete Zunahme der prozentualen Trabekelfläche könnte in der Gewichtszunahme der Tiere begründet sein, welche bei den jungen adulten Tieren (3 Monate) noch stark ausgeprägt ist.

Da alle Tiere der gleichen Behandlung und Haltung unterzogen wurden, sind Schlussfolgerungen bezüglich unterschiedlicher Wirkungen der Testsubstanzen dennoch möglich. Insbesondere die Resultate der 3. Obduktionsgruppe können aufgrund ihres hohen Stichprobenumfangs als sehr aussagekräftig angesehen werden. Beim Design einer neuen Studie empfiehlt es sich der SF-Orx-Kontrolle eine nicht-Orchiectomierte Kontrolle zuzufügen, um die Induktion der Osteoporose besser verifizieren zu können.

5.3 Wirkung der Testsubstanzen auf den osteoporotischen Knochen

In unserer Studie sollte geklärt werden, ob die Substanzen DHT, E2, GEN und EQ einen positiven Effekt auf den osteoporotischen Knochen haben. Um diesen Effekt quantifizieren zu können, wurden die mikrostrukturellen Veränderungen verschiedener Knochenkompartimente betrachtet. Der gewählte Versuchsaufbau ermöglicht eine Beurteilung der therapeutischen Wirkung der getesteten Substanzen, indem den Versuchstieren die Testsubstanzen erst nach der Ausbildung der Osteoporose verabreicht wurden (4 Wochen post Orx). Im Gegensatz zum hier verwendeten therapeutischen Versuchsaufbau kommt in der aktuellen Forschung häufiger der präventive Versuchsansatz zum Einsatz, bei dem die Testsubstanzen unmittelbar nach der Orx appliziert werden. Unsere Ergebnisse können also zur Abwägung der Fragestellung herangezogen werden, ob Sexualhormone und Phytoöstrogene eine mögliche alternative Therapieoption in der Behandlung der männlichen Osteoporose darstellen. Darüber hinaus geben die Ergebnisse Aufschluss über die Wirkunterschiede der Testsubstanzen auf die mikrostrukturellen Eigenschaften des osteoporotischen Knochens, die letztlich entscheidend für die Qualität des Knochens sind.

5.3.1 Wirkung der Sexualhormone auf den Knochen

Es ist hinlänglich bekannt, dass Sexualhormone eine zentrale Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels und der Pathologie der Osteoporose spielen (Frenkel et al. 2010, Orwoll et al. 2006, Falahati-Nini et al. 2000, Leder et al. 2003), wobei den Östrogenen, auch beim männlichen Geschlecht, eine größere Bedeutung zukommt als den Androgenen (Khosla et al. 2001). Die in unserer Studie verwendeten Sexualhormone sind charakteristische Vertreter dieser Gruppen.

Das E2 ist das wirksamste Östrogen und wirkt über die ER-Rezeptoren, während das DHT seine Wirkung nur über AR-Rezeptoren entfaltet, da es im Gegensatz zu Testosteron

nicht über das Enzym Aromatase zu Östrogen metabolisiert werden kann (Wang und Swerdloff 2002).

Daher ist es durch unsere Ergebnisse möglich, Aussagen über die Bedeutung der ER-vermittelten östrogenen Wirkung bzw. der AR-vermittelten androgenen Wirkung auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Rattentibia zu treffen. Dies ist in vielen anderen Studien nicht möglich, da häufig Testosteron als Vertreter der Androgene verwendet wird, was gleichzeitig dazu führt, dass nur wenige Studien zum Vergleich heranziehbar sind.

Die Wirkung von DHT auf den männlichen, osteoporotischen Knochen

In unserer Studie bewirkte die Applikation von DHT nach Ausbildung der Osteoporose deutliche Veränderung sowohl im kortikalen als auch im spongiosen Knochenkompartiment, die auf eine positive Wirkung von DHT auf den osteoporotischen Knochen schließen lassen.

So konnte sowohl nach 2- als auch nach 9-wöchiger Substanzapplikation eine, im Vergleich zur SF-Kontrollgruppe, signifikant breitere Kortikalis im diaphysären Bereich des Knochens gemessen werden. Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war die Kortikalisdicke um 8,16% breiter als die der SF-Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass Androgene beim männlichen Geschlecht zu einem verstärkten periostalen Knochenanbau und somit zu einer Zunahme der Kortikalisdicke führen (Seemann 2002). Diese Wirkung scheint jedoch nur im Bereich der Diaphyse Gültigkeit zu besitzen, denn im Bereich der metaphysären Kortikalis konnte keine signifikante Veränderung der Kortikalisdicke durch DHT beobachtet werden.

Ein positiver Effekt konnte jedoch in der Spongiosa beobachtet werden. Nach 2- bzw. 3-wöchiger Applikation von DHT konnte gegenüber der SF-Kontrollgruppe zwar noch keine prozentual größere Trabekelfläche festgestellt werden, jedoch war diese nach 9-wöchiger Applikation unverkennbar größer als in der SF-Kontrollgruppe (+12,9%). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass DHT einige Zeit bis zur Entfaltung einer messbaren Wirkung benötigt.

Insgesamt gehen unsere Resultate mit den Erkenntnissen konform, dass DHT sowohl dem Verlust des kortikalen als auch des trabekulären Knochens verhindern kann (Vanderschueren et al. 1992, Vandenput et al. 2002). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Forschungsgruppen, die einen deutlich stärkeren Effekt von DHT auf die Spongiosa postulieren, sind in unserer Studie die Effekte auf den kortikalen Knochen vergleichbar stark ausgeprägt. Diese Abweichung kann möglicherweise durch das unterschiedliche Alter der Versuchstiere erklärt werden. In unserer Studie arbeiteten wir mit postpubertären Ratten, während Vandenput und Vanderschueren 12 bzw. 13 Monate

alte Tiere verwendeten. Es wird angenommen, dass die über AR-Rezeptoren vermittelte Wirkung der Androgene insbesondere in der Adoleszenz eine größere Bedeutung zukommt (Khosla und Riggs 2003), was durch unsere Ergebnisse an jüngeren Tieren unterstützt werden kann.

Insgesamt kann die erwartete positive Wirkung des DHTs auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte durch unsere Ergebnisse bestätigt werden.

Bei der Betrachtung der Mikrostruktur der Spongiosa lassen sich ebenfalls Wirkungen des DHT auf den osteoporotischen Knochen festhalten. Während des 9-wöchigen Versuchsablaufs blieb die Anzahl der Trabekel nahezu auf konstantem Niveau, während die der SF-Kontrollgruppe drastisch abnahm. Dies bestätigt die These, dass Androgene bei Männern für die Aufrechterhaltung der Trabekelanzahl verantwortlich sind (Khosla et al. 2006).

Die mediane Trabekelgröße bzw. der Feretdurchmesser nahm in der DHT-Gruppe stark ab. Woraus zu schlussfolgern ist, dass die vorhandenen Trabekel in ihrer Fläche kleiner werden.

Die Kompaktheit der Trabekel blieb während des 9-wöchigen Versuchs nahezu unverändert, war aber nach 9-wöchiger Substanzapplikation 5,9% größer im Vergleich zur SF-Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass die Trabekel in der DHT-Gruppe sich stärker verzweigten als in der SF-Kontrollgruppe.

Aufgrund der interaktiven Bildanalyse scheint es logisch, dass es bei einer Zunahme der Trabekelverzweigung zu einer Abnahme der Trabekelanzahl kommen kann und umgekehrt. Vereinfacht dargestellt, entstehen aus drei gleichgroßen Trabekeln von denen sich zwei miteinander verzweigen, zwei Trabekel, wobei einer die doppelte Größe des anderen aufweist. Die Verzweigung der Trabekel kann jedoch durchaus zunehmen, ohne dass die Trabekelanzahl abnimmt, wenn neue Trabekel entstehen. Wenn zu oben dargestelltem Beispiel ein kleiner, neuer Trabekel hinzukommt, bleibt die Trabekelanzahl konstant. So wird erklärbar, dass die gesamte prozentuale Trabekelfläche in der DHT-Gruppe zunimmt.

In der Zusammenschau der mikrostrukturellen Veränderungen in der DHT-Gruppe kann geschlussfolgert werden, dass die Zunahme der gesamten prozentualen Trabekelfläche durch die Entstehung neuer Trabekel bedingt ist. Diese neuentstandenen Trabekel sind in ihrer Fläche wahrscheinlich zunächst kleiner, da die mediane Trabekelgröße und der Feretdurchmesser über den Versuchszeitraum abnehmen. Insgesamt kommt es zu einer zunehmenden Verzweigung der Trabekel untereinander, was vermutlich zu einer erhöhten Stabilität des Knochens beiträgt.

An dieser Stelle sei noch einmal hervorgehoben, dass der Knochen einem ständigen Knochenumbau unterliegt und die hier erhobenen Ergebnisse lediglich einen Auszug der im Knochengewebe ablaufenden dynamischen Prozesse darstellen. Die Resultate bezüglich der Veränderungen der Mikrostruktur sind daher als tendenzielle Wirkung der getesteten Substanz zu interpretieren.

Tab. 3 Zusammenfassung der Wirkungen von DHT auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Versuchsergebnissen abgeleitet werden können.

Wirkung von DHT auf den osteoporotischen Knochen:

- verhindert den kortikalen Knochenverlust
- verhindert den spongiösen Knochenverlust
- verhindert den Verlust der TbN
- verhindert die Abnahme der Verzweigung
- die mediane Trabekelfläche nimmt ab (es entstehen verhältnismäßig mehr kleine Trabekel)

Die Wirkung von E2 auf den männlichen, osteoporotischen Knochen

E2 stellt den entscheidenden Faktor für die Pathogenese der Osteoporose des Mannes dar (Khosla et al. 2001). Die osteoporoseverhindernde Wirkung von E2 ist hinlänglich bekannt (Ohlsen und Vandenput 2009, Rossouw et al. 2002). In unserer Studie konnte ein knochenprotektiver Effekt von E2 sowohl auf den kortikalen als auch auf den spongiösen Knochen bestätigt werden.

Sowohl nach 2- als auch nach 9-wöchiger Applikation von E2 konnte eine signifikante Zunahme der Kortikalisdicke im Bereich der Diaphyse gegenüber der SF-Kontrollgruppe beobachtet werden. Nach 9-wöchiger Substanzgabe war die Kortikalisdicke um 4,0% größer als die der Vergleichsgruppe. Das Ergebnis bestätigt, dass E2 den kortikalen Knochenverlust bei männlichen Ratten verhindern kann (Vandenput et al. 2002). E2 konnte jedoch nicht dem Knochenverlust im metaphysären Bereich der Kortikalis entgegenwirken.

Eine den Knochenverlust verhindernde Wirkung konnte in der Spongiosa festgestellt werden. Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war die prozentuale Trabekelfläche um 4,4% größer als die der SF-Kontrollgruppe. Insbesondere bei der Berücksichtigung des Körpergewichts wird der den anderen Substanzgruppen überlegene Effekt des E2 auf die Spongiosa erkennbar (E2 +22,7%). Das bestätigt die Kenntnis, dass E2 knochenprotektiv auf den spongiösen Knochen der männlichen Ratte wirkt (Vandenput et al. 2002).

Bei der Betrachtung der mikrostrukturellen Trabekeleigenschaften ließ sich in der E2-Gruppe nach 9-wöchiger Substanzapplikation eine dezente Abnahme der Trabekelanzahl gegenüber der SF-Kontrollgruppe verzeichnen. Über den Versuchszeitraum war die Trabekelanzahl in den einzelnen Obduktionsgruppen jedoch nahezu konstant. Die 3. Obduktionsgruppe hatte 1,8% mehr Trabekel als die 1. Obduktionsgruppe. Im Vergleich zur SF-Kontrollgruppe, die einen drastischen Verlust der Trabekel erfuhr, spricht das für eine positive Wirkung des Östrogens auf die

Trabekelanzahl. Dies bestätigt die Schlüsse anderer Forschungsgruppen, dass Östrogen dem Verlust der Trabekelanzahl entgegenwirkt (Stürmer et al. 2009).

Die mediane Trabekelgröße war sowohl nach 2- als auch nach 9-wöchiger Substanzapplikation signifikant größer als die der SF-Kontrollgruppe. Analog dazu verhielt sich der Feretdurchmesser. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Flächen der einzelnen Trabekel in der E2-Gruppe größer sind, als die der SF-Kontrollgruppe.

Im Gegenzug nahm die Kompaktheit ab und war nach 9-wöchiger Substanzapplikation signifikant niedriger gegenüber

der SF-Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass es zu einer Reduktion der Verzweigungen während des Versuchszeitraums kam.

Zusammenfassend kann ein positiver Effekt von E2 sowohl auf den kortikalen als auch auf

Tab. 4 Zusammenfassung der Wirkungen von E2 auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Studienergebnissen abgeleitet werden können.

Wirkung von E2 auf den osteoporotischen Knochen:

- verhindert den kortikalen Knochenverlust
- verhindert den spongiösen Knochenverlust
- verhindert den Verlust der TbN
- es entstehen verhältnismäßig (zur SF-Gruppe) größere Trabekel
- kann der Abnahme der Verzweigung nicht entgegenwirken

den spongiösen Knochen bestätigt werden (Vandenput et al. 2002). Die Zunahme der prozentualen Trabekelfläche in der E2-Gruppe scheint durch die Aufrechterhaltung der Trabekelanzahl, insbesondere jedoch durch die starke Zunahme der Fläche der einzelnen Trabekel, bedingt zu sein.

Vergleich der Wirkung von E2 und DHT auf die Kortikalis und Spongiosa

Die Sexualhormone haben einen positiven Effekt sowohl auf den kortikalen als auch auf den trabekulären Knochen.

Beide, DHT und E2, wirken dem Knochenverlust in der diaphysären Kortikalis entgegen und haben keinen Effekt auf die Kortikalis im metaphysären Bereich.

In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei männlichen Tieren ER α und AR-Rezeptoren für das kortikale Knochenwachstum verantwortlich sind (Venken et al. 2006, Vidal et al. 2000). Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass auch bei männlichen Ratten der kortikale Knochenstoffwechsel sowohl über ER-Rezeptoren als auch über AR-Rezeptoren positiv beeinflusst wird. Die stärkere Wirkung des DHT auf die Kortikalisfläche bestätigt die Annahme, dass DHT die periostale Apposition fördert (Seemann 2002). Es ist anzunehmen, dass DHT durch diesen Mechanismus den Knochen stabilisiert und dadurch wesentlich zu dem geringeren Frakturrisiko bei Männern beitragen könnte.

Die Effekte der Sexualhormone auf die Spongiosa unterscheiden sich in den mikrostrukturellen Veränderungen. Beide Sexualhormone beeinflussen die

Trabekelanzahl dahingehend, dass sie auf stabilem Niveau gehalten wird. Interessanter Weise haben DHT und E2 jedoch unterschiedliche Wirkungen auf die mediane Fläche der einzelnen Trabekel/Feretdurchmesser. Während E2 zu einer signifikanten Zunahme der medianen Trabekelgröße führt, kann DHT diese Wirkung nicht zeigen, im Gegenteil es kommt zu einer Abnahme der medianen Trabekelgröße unter DHT d.h. die Trabekel werden dünner und schmaler.

Begründet werden können diese Wirkunterschiede durch die unterschiedliche Wirkentfaltung von DHT und E2 an den östrogenen bzw. androgenen Rezeptoren, die beide in der Spongiosa exprimiert werden. In Experimenten mit männlichen Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Trabekelanzahl sowohl von ER α als auch von AR aufrechterhalten wird, während die Trabekeldicke nur von ER α erhalten wird (Movérare et al. 2003). Unsere Ergebnisse gehen konform mit dieser These und lassen auch für männliche Ratten auf eine Gültigkeit dieser schließen.

Des Weiteren ist interessant, dass DHT dem Verlust der Verzweigungen entgegenwirkt, wenn auch nicht signifikant, E2 hingegen diesen Verlust signifikant nicht verhindern kann. Es ist zu vermuten, dass die Trabekelverzweigungen ebenfalls rezeptorspezifisch reguliert werden.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass im Gegensatz zu anderen Studien (Vandenput et al. 2002) in unserer Studie ein stärkerer Effekt von DHT im Vergleich zu E2 sowohl auf die Kortikalis als auch auf die Spongiosa verzeichnet werden konnte. Dies kann durch die unterschiedliche Gewichtszunahme der Tiere erklärt werden. Die Östrogen-Tiere hatten ein niedrigeres Körpergewicht und daraus resultierend auch eine geringere Knochenmasse. Aus diesem Grund erfolgte in unserer Studie eine Korrelation der Trabekelfläche zum Körpergewicht, so dass die Wirkstärken der Testsubstanzen besser beurteilt werden konnten. Hier stellte sich ein stärkerer - nicht durch Gewichtsunterschiede kaschierter Effekt des Östrogens auf den Knochen dar.

Bei Betrachtung des Wirkeintritts der beiden Sexualhormone lässt sich erkennen, dass E2 deutlich rascher seine Wirkung auf den spongiösen Knochen entfaltet als DHT, das scheinbar erst verzögert in den Knochenstoffwechsel eingreift.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl DHT als auch E2 einen positiven Effekt auf die osteoporotischen Knochen gezeigt haben. Ob diese Wirkung ausreichend ist, um die Osteoporose vollständig zurückzubilden kann durch unsere Studie nicht belegt werden. Hierzu wäre ein Vergleich zu präorchiotomierten Tieren notwendig.

5.3.2 Wirkung der Phytoöstrogene auf den Knochen

Phytoöstrogene sind östrogen-ähnliche Substanzen mit Wirkung im Sinne von selektiven Östrogenrezeptormodulatoren. In unserer Studie wurde die Wirksamkeit der Phytoöstrogene Genistein und Equol auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte im Vergleich zu den gonadalen Steroiden untersucht. Es wurden auch hier die gleichen Parameter zur Beurteilung der Knochenstrukturen herangezogen.

Wirkung von GEN auf den osteoporotischen Knochen

Das Phytoöstrophen Genistein zeigte sowohl eine positive Wirkung auf die Kortikalis im diaphysären als auch auf den metaphysären Bereich. Obgleich der Effekt auf die Diaphyse im Gegenzug zur Metaphyse nicht signifikant war.

Interessanterweise nahm in der Genistein-Gruppe die Kortikalisdicke in der Diaphyse über den 9-wöchigen Versuchszeitraum, wie in allen anderen Gruppen auch, kontinuierlich ab. Die Abnahme der Phytoöstrophen-Gruppen war jedoch am geringsten. In der Metaphyse hingegen nahm die Kortikalisdicke progredient und am stärksten zu (GEN +10,7% vs. SF nach 9-wöchiger Applikation). Aus diesen Ergebnissen ist zu schlussfolgern, dass Genistein wohl eine schwache Wirkung in der Diaphyse, aber durchaus eine starke Wirkung auf die Kortikalis der Metaphyse der männlichen Ratte zu haben scheint.

Die prozentuale Trabekelfläche nahm während des 9-wöchigen Versuchszeitraums deutlich stärker ab als in allen anderen Gruppen und war nach 9 Wochen auch gegenüber der SF-Kontrollgruppe stark erniedrigt. Genistein oblag es in unserer Studie nicht dem Verlust des trabekulären Knochens entgegenzuwirken. Konträr zu anderen Arbeiten (Fanti et al. 1998) konnten wir nicht bestätigen, dass Genistein eine überwiegend knochenprotektive Wirkung auf die Spongiosa im Vergleich zur Kortikalis zeigt. Diese Forschungsgruppe arbeitete jedoch mit weiblichen Ratten. Nichts desto trotz zeigten auch präventive Untersuchungen an männlichen Mäusen eine stärkere positive Wirkung auf die Spongiosa (Ishimi et al. 2002), die so in unserer Studie nicht zu beobachten war. Es lässt sich

Tab. 5 Zusammenfassung der Wirkungen von GEN auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Versuchsergebnissen abgeleitet werden können

Wirkung von GEN auf den osteoporotischen Knochen:

- verhindert den kortikalen Knochenverlust
- kann dem spongiösen Knochenverlust nicht entgegenwirken
- kann dem Verlust der TbN nicht entgegenwirken
- es entstehen verhältnismäßig (zur SF-Gruppe) größere Trabekel
- führt zu einer stärkeren Trabekelverzweigung

vermuten, dass Genistein zwar eine präventive Wirkung auf den spongiösen Knochen der männlichen Tiere zeigt, jedoch keine positive Wirkung am bereits osteoporotischen Knochen hat.

Bei der Betrachtung der mikrostrukturellen Parameter fällt ins Auge, dass die Trabekelanzahl während des 9-wöchigen Versuchszeitraums stark abnahm. Sie war auch nach 9-wöchiger Substanzapplikation gegenüber der SF-Kontrollgruppe deutlich reduziert. Die mediane Trabekelgröße und der Feretdurchmesser nahmen während des Versuchszeitraums zwar ab, jedoch waren sie nach 2- und 9-wöchiger Substanzapplikation signifikant größer als die, der SF-Kontrollgruppe – ähnlich der E2-Gruppe. Die Kompaktheit war ebenfalls nach 9-wöchiger Substanzapplikation signifikant größer als die, der SF-Kontrollgruppe. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Genistein eine Wirkung auf die trabekuläre Mikrostruktur hat. Die Trabekel verzweigen sich stark, wodurch es zu einem Zusammenschluss von Trabekeln kommt, was sich in einer Reduktion der Trabekelanzahl ausdrückt. Beispielhaft ausgedrückt: verzweigen sich 5 gleichgroße Trabekel miteinander, entsteht ein in der Fläche wesentlich größerer Trabekel. Da die gesamte prozentuale Trabekelfläche jedoch abnimmt, ist davon auszugehen, dass die Reduktion der Trabekelanzahl nicht ausschließlich von der Verzweigung herrührt, sondern es darüber hinaus zu einem Verlust von Trabekeln kommt oder die Trabekel wesentlich dünner und schmaler werden. Darauf deutet die Abnahme der medianen Trabekelgröße über den Versuchszeitraum hin. Die Zunahme der Verzweigung muss nicht zwingend mit einer Abnahme der Trabekelzahl einhergehen, wenn sich zwar vermehrt Ausläufer bilden, diese aber nicht zu Trabekelverknüpfungen führen.

Da insbesondere die Spongiosa zur Stabilität des Knochens beiträgt, ist nicht auszuschließen, dass Genistein, da es die Verzweigung positiv beeinflusst, zu einer erhöhten mechanischen Knochenstabilität beitragen könnte (Sehmisch et al. 2010).

Wirkung von EQ auf den osteoporotischen Knochen

Das Phytoöstrogen Equol zeigte sowohl auf die Kortikalis der Diaphyse als auch in der Metaphyse nach 9-wöchigem Versuchsablauf eine signifikante Wirkung gegenüber der SF-Kontrollgruppe. In der Equol-Gruppe kam es – wie in der GEN-Gruppe auch – über den Versuchszeitraum zu einer nur geringen Abnahme der diaphysären und zu einer Zunahme der metaphysären Kortikalisdicke.

In der Spongiosa war nach 9-wöchiger Substanzapplikation ein starker Verlust der prozentualen Trabekelfläche gegenüber der SF-Kontrollgruppe zu verzeichnen, der jedoch nicht das niedrige Niveau der GEN-Gruppe erreichte. Unsere Ergebnisse sind damit konträr zu einer Studie mit älteren, männlichen Ratten, die eine positive Wirkung

von Daidzein, der Vorstufe des Equols auf die Spongiosa zeigen konnte (Filipovic et al. 2009). Obwohl anzumerken ist, dass bei EQ im Gegensatz zu Genistein von der 1. zur 3. Obduktionsgruppe eine Zunahme der prozentualen Trabekelfläche zu verzeichnen war und sich die Frage stellt, ob EQ bei längerer Substanzapplikation eine bessere Wirkung auf die Spongiosa gehabt hätte.

In den mikrostrukturellen Veränderungen zeigte sich ein starker Verlust der TbN. Die mediane Fläche eines Trabekels/Feretdurchmesser nahmen während des Versuchs ab, waren nach 9-wöchiger

Substanzapplikation jedoch höher als in der SF-Kontrollgruppe, wenn auch nicht signifikant – was konform mit der Erkenntnis anderer Forschungsgruppen ist, dass EQ zu einer Zunahme der Trabekeldicke führt (Filipovic et

Tab. 6 Zusammenfassung der Wirkungen von EQ auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Versuchsergebnissen abgeleitet werden können

Wirkung von EQ auf den osteoporotischen Knochen:

- verhindert den kortikalen Knochenverlust
- verhindert nicht den spongiösen Knochenverlust
- verhindert nicht den Verlust der TbN
- die mediane Trabekelfläche nimmt ab
- führt zu einer stärkeren Trabekelverzweigung

al. 2009). Die Kompaktheit der EQ-Gruppe hingegen nahm während des Versuchszeitraums zu und war auch nach 9-wöchiger Substanzapplikation signifikant höher als die, der SF-Kontrollgruppe.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass EQ eine mit Genistein vergleichbare Wirkweise auf die Mikrostruktur des spongiösen Knochens hat. In der EQ-Gruppe nehmen die Verzweigungen stark zu, wodurch es durch die Verknüpfung von Trabekeln zu einer Reduktion der Trabekelanzahl kommt. In unserer Studie kann Equol dem osteoporotischen Knochenverlust in der Spongiosa zwar nicht entgegenwirken, hat aber dennoch Wirkung auf den trabekulären Knochen.

Vergleich der Wirkung von GEN und EQ auf die Kortikalis und Spongiosa

Beide Phytoöstrogene haben eine positive Wirkung auf die Kortikalis, wobei die Wirkung von Equol, der von Genistein in der Diaphyse überwiegt.

Bezüglich ihrer Wirkung auf die Spongiosa verhalten sich beide Phytoöstrogene ähnlich, jedoch zeigt GEN eine stärkere Reduktion der prozentualen Trabekelfläche und der Trabekelanzahl. Die Applikation von EQ hingegen führt zu einer höheren Kompaktheit der Trabekel und spricht daher für eine stärkere Wirkung von EQ auf die Trabekelverzweigung. Insgesamt hat also EQ eine bessere Wirkung auf den osteoporotischen Knochen als Genistein, was konform ist mit der These, dass EQ das Phytoöstrogen mit der größeren östrogenen Aktivität ist (Fonseca und Ward 2004).

Nichtsdestotrotz bleibt die Wirkung von Genistein und Equol auf die Spongiosa deutlich hinter der SF-Kontrollgruppe zurück.

Vergleich der Wirkung von Phytoöstrogenen auf die männliche, orx-Ratte und die weibliche ovx-Ratte

Die Wirkung der Phytoöstrogene auf männliche, orx-Ratten, die in unserer Studie untersucht wurde, unterscheidet sich von der, auf weibliche, ovx-Ratten. Für weibliche Tiere wird eine präventive und therapeutische Wirkung der Phytoöstrogene sowohl auf den kortikalen als auch den trabekulären Knochen postuliert (Sehmisch et al. 2010; Bitto et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Tierversuche führten soweit, dass die Wirkung der Phytoöstrogene auch an postmenopausalen Frauen eruiert wurde und in der Tat positive Effekte auf den Knochen gezeigt werden konnten (Marini et al. 2007). Die Untersuchungen an männlichen Tieren sind spärlich und in den wenigen vorliegenden Studien wurde der präventive Versuchsaufbau gewählt (Ishimi et al. 2002, Filipovic et al. 2009). In unserer therapeutisch angelegten Studie konnte zwar ein positiver Effekt der Phytoöstrogene auf die Kortikalis beschrieben werden, einen die Osteoporose aufhebender Effekt in der Spongiosa muss jedoch verneint werden, auch wenn die Phytoöstrogene mikrostrukturelle Wirkungen auf den trabekulären Knochen zeigten.

Diese Wirkunterschiede bei männlichen und weiblichen Tieren könnten durch die an unterschiedlichen Rezeptoren vermittelte Wirkung der Testsubstanzen erklärbar sein. Während DHT über AR-Rezeptoren und E2 über ER α und ER β wirken, wirkt Genistein überwiegend über ER β , Equol hingegen über ER α und ER β .

In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei männlichen Tieren zwar der AR-Rezeptor und der ER α -Rezeptor eine Rolle im Knochenstoffwechsel spielen, nicht jedoch der ER β . Der ER β hat bei weiblichen Tieren hingegen eine regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel (Ohlson und Vandenput 2009). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede haben sowohl in der Kortikalis als auch in der Spongiosa des Knochens Gültigkeit. Aus dieser Erkenntnis könnte, sofern auf männliche Ratten übertragbar, die mangelnde Wirkung der Phytoöstrogene auf den männlichen, osteoporotischen Knochen erklärbar sein.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Sexualhormone, Dihydrotestosteron (DHT) und Östrogen (E2), sowie der Phytohormone, Genistein (GEN) und Equol (EQ), auf den osteoporotischen Knochen der männlichen Ratte zu untersuchen.

Der Versuch wurde an 150 adulten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Zunächst wurden die Tiere zur Induktion einer Osteoporose orchietomiert (orx) und über ein Zeitintervall von 4 Wochen mit sojafreiem Futter versorgt. Anschließend wurden die Tiere in 5 Gruppen zu je 30 Tieren eingeteilt, von denen 4 Gruppen als Verum DHT, E2, GEN oder EQ mit dem Futter erhielten. Eine Gruppe wurde weiterhin sojafrei ernährt und diente der Kontrolle (SF). Nach 2, 3 bzw. 9 Wochen wurden jeweils 10 Tiere einer Gruppe obduziert, dabei wurden die rechten Tibiae entnommen und im Anschluss in Kunststoffblöcke eingebettet. Die histologische und histomorphometrische Analyse wurde an Goldner-gefärbten Semidünnschnitten vorgenommen, an denen die meta- und diaphysäre Kortikalisdicke, die Spongiosafläche, die Trabekelanzahl sowie, als Parameter für die Trabekelgröße, die mediane Trabekelgröße und der Feretdurchmesser als auch, als Parameter für die Trabekelverzweigung, die Kompaktheit der Trabekel gemessen wurden.

Als wesentliches **Ergebnis** konnten eine osteoporotische Knochenveränderung im Sinne einer Abnahme der Kortikalisdicken und in der Spongiosa eine Abnahme der Trabekelanzahl und der Trabekelverzweigung in der SF-Gruppe festgestellt werden.

Nach 9-wöchiger Hormonbehandlung war die *diaphysäre Kortikalis* in der **DHT**-Gruppe um 42µm (+8,2%; n=352) und in der **E2**-Gruppe um 20,5µm (+4,0%; n=272) signifikant dicker ($p \leq 0,05$) als in der SF-Referenzgruppe (514,2µm; n=362). Die Dicke der *metaphysären Kortikalis* unterscheidet sich in beiden Gruppen nicht von der SF-Gruppe. Auf die Spongiosa haben DHT und E2 einen positiven Effekt. Nach 9 Wochen war die *gewichtsadaptierte Trabekelfläche* (%TbA/100g KG) um 11% (DHT) bzw. 22,7% (E2) größer als in der Kontrollgruppe. Im Vergleich zu DHT scheint die Wirkung von E2 auf die Spongiosa stärker ausgeprägt zu sein und frühzeitiger einzutreten.

Die *Trabekelanzahl* blieb bei beiden Gruppen konstant. Die *mediale Trabekelgröße* war nach 9 Wochen in der E2-Gruppe um 88% (+219,6µm²; n=1101) größer gegenüber der SF-Gruppe (247,3 µm²=100%; n=1426), während sie in der DHT-Gruppe um 14,7% (-36,4µm²; n=1173) kleiner war.

Die Phytoöstrogene, **GEN** und **EQ**, haben einen positiven Effekt auf die Kortikalis. Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war die *diaphysäre Kortikalis* in der GEN-Gruppe um

11,6µm (+2,2%; n=252) nicht signifikant, in der EQ-Gruppe um 20,6µm (+4,0%; n=282) signifikant dicker als in der SF-Kontrolle. Die *Kortikalis in der Metaphyse* war sowohl in der GEN-Gruppe, um 44,6µm (+10,1%; n=701), als auch in der EQ-Gruppe, um 30,8µm (+7,0%; n=762), signifikant dicker als in der SF-Gruppe.

In der Spongiosa hingegen konnten GEN und EQ der orx-induzierten Osteoporose nicht entgegenwirken. Die *gewichtsadaptierte Spongiosafläche (%TbA/ 100g KG)* war nach 9-wöchiger Applikation in der GEN-Gruppe um -30,7%, in der EQ-Gruppe um -11,3 % gegenüber der SF-Kontrolle reduziert.

Die geringere Spongiosafläche gegenüber der Referenzgruppe ist in beiden Phytoöstrogengruppen vor allem durch die starke Reduktion der *Trabekelanzahl* bedingt (GEN: -24,8%, EQ-17,5% vs. SF). Beide Phytoöstrogene haben jedoch einen positiven Einfluss auf die Trabekelverzweigung. Nach 9-wöchiger Substanzapplikation war die *Kompaktheit* der GEN-Gruppe mit 18,0 (+27,5%; n=915) und der EQ-Gruppe mit 24,0 (+36,7%; n=1033) signifikant größer als in der SF-Gruppe. Insgesamt betrachtet ist EQ das Phytoöstrogen mit der besseren Wirkung auf den osteoporotischen Knochen der männlichen S.D.-Ratte.

Zusammenfassend kann daher aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, dass bei der männlichen Osteoporose die Sexualhormone, DHT und E2, eine bessere Wirkung auf den spongiösen Knochen als die Phytoöstrogene, GEN und EQ, haben, während die Kortikalis umgekehrt effizienter durch GEN und EQ als durch DHT und E2 vor den Folgen einer Osteoporose schützt.

Bei der Betrachtung der Studienergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur kann vermutet werden, dass Phytoöstrogene im männlichen und weiblichen Knochenstoffwechsel unterschiedlich wirken.

7. Anhang

7.1 Ergebnistabellen

Tab. A-1 Übersicht zur Herstellung von Hartschnittpräparaten: Angegeben sind die einzelnen Prozesse, die zur Herstellung durchlaufen werden müssen, die dazu benötigten Chemikalien und die jeweilige Dauer und Temperatur der Anwendung.

Prozessstufen	Materialien	Dauer, T in °C
Fixation	4%ige neutral gepufferte Formalinlösung (mit 0,1 M Phosphatpuffer)	7 d
Dehydratation	Ethanol 70%	24h, 20°C
	Ethanol 70%	24h, 20°C
	Ethanol 90%	24h, 20°C
	Ethanol 96%	24h, 20°C
	Ethanol 96%	24h, 20°C
	Ethanol 100%	24h, 20°C
	Ethanol 100%	24h, 20°C
	Ethanol 100%	24h, 20°C
Lipolyse	Xylol	24h, 20°C
	Xylol	24h, 20°C
	Xylol	24h, 20°C
Präinfiltration	Xylol/Technovit 9100 NEU 50%/50%	
	Technovit 9100 NEU Basis	24h, 4°C
	Technovit 9100 NEU Basis + Härter 1	24h, 4°C
	Technovit 9100 NEU Basis + Härter 1	24h, 4°C
	Technovit 9100 NEU Basis + Härter 1 +PMMA-Pulver	24h, 4°C
	Technovit 9100 NEU Basis + Härter 1 +PMMA-Pulver	24h, 4°C
	Technovit 9100 NEU Basis + Härter 1 +PMMA-Pulver	24h, 4°C
	Technovit 9100 NEU Basis + Härter 1 +PMMA-Pulver	24h, 4°C
Blockherstellung	Stammlösung A + B im Verhältnis 9:1 → 10 min. Exsikkator	2-3d, -8°C

Tab. A-2 Übersicht zur Anfertigung der Goldner-Färbung: angegeben sind die einzelnen Bearbeitungsschritte sowie die Dauer der Anwendungen.

Dauer	Arbeitsschritte
10 min	Weigerts Eisenhämatoxylin (Kernfärbung)
10 min	Spülung unter fließendem Wasser
45 min	Säurefuchsin-Ponceau
1 min	Abspülen mit 1%iger Essigsäure
	Abspülen mit Aqua dest.
7 min	Phosphorwolframsäure – Orange (vollständige Gewebeentfärbung)
1 min	Abspülen mit 1%iger Essigsäure
10 min	Lichtgrün (Gegenfärbung)
5 min	Auswaschen mit 1%iger Essigsäure
je 5min	Aufsteigende Alkoholreihe 96% - 100% (Entwässerung)
5 min	Xylol, Einschlussharz

Tab. A-3 Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Goldner-Färbung.

<u>Weigerts Hämatoxylin</u> Lösung A + B werden im Verhältnis 1:1 verwendet Lösung A: 1g Hämatoxylin in 100ml 96%igem Ethanol lösen Lösung B: 1.16g Eisen(III)-chlorid in 99ml Aqua dest. lösen dann 1ml 25%ige Salzsäure zusetzen
<u>Säurefuchsin-Ponceau</u> 2g Ponceau de Xylidine + 1g Säurefuchsin + 0,4ml 1%ige Essigsäure + 200ml Aqua dest.
<u>Phosphorwolframsäure-Orange:</u> 2g Wolframatophosphorsäure und 1g Orange G in 200ml Aqua dest. lösen
<u>Lichtgrün:</u> 0,4g Lichtgrün in 200ml Aqua dest., das mit 0,4ml Essigsäure versetzt wurde, lösen.

Tab. A-4 Körpergewicht der Rattentiere, angegeben als Mittelwert in Gramm (g) und Anzahl (n) vor der Orchiektomie (Prä-Orx), sowie nach 2-, 3- und 9-wöchiger Applikation von DHT, E2, GEN, EQ bzw. der SF-Kontrollgruppe.

Körpergewicht (g)		
Gruppe	Mittelwert (g)	Anzahl (n)
Prä-Orx		
SF	346,12	30
DHT	349,27	30
E2	350,17	30
GEN	350,67	30
EQ	349,42	30
2-wöchige Substanzapplikation		
SF	397,83	10
DHT	393,24	10
E2	364,83	10
GEN	406,27	10
EQ	400,55	10
3-wöchige Substanzapplikation		
SF	414,91	10
DHT	410,99	10
E2	364,3	9
GEN	441,24	10
EQ	419,6	10
9-wöchige Substanzapplikation		
SF	434,8	10
DHT	442,86	10
E2	369,66	9
GEN	429,34	10
EQ	436,12	10

Tab. A-5 Mittelwerte (μm) der Kortikalisdicke im diaphysären Bereich für die verschiedenen Testgruppen nach 2-, 3- und 9 wöchiger Applikation, sowie Stichprobenumfang (n) der Messwerte, Standardabweichung (STDAB), Standardfehler (STF) und Signifikanz bezüglich der Referenzgruppe, $p \leq 0,05$, Varianzanalyse mittels ANOVA und Holm-Sidak.

Kortikalisdicke im diaphysären Bereich					
Gruppe	Mittelwert (μm)	n	STDAB	STF	Signifikanz
2-wöchige Substanzapplikation					
SF	554,2	362	109,8	7,06	-
DHT	590,7	132	70,0	6,10	JA
E2	612,4	142	107,9	9,06	JA
GEN	544,2	122	104,6	9,47	NEIN
EQ	563,8	164	49,9	3,90	NEIN
3-wöchige Substanzapplikation					
SF	642,9	102	129,9	12,87	-
DHT	565,5	182	109,3	8,10	JA
E2	540,3	260	108,0	6,7	JA
GEN	528,3	282	78,5	4,67	JA
EQ	573,9	172	116,3	8,87	JA
9-wöchige Substanzapplikation					
SF	514,2 (100%)	362	70,8	3,72	-
DHT	556,2 (+8,16%)	352	97,9	5,22	JA
E2	534,7 (+3,98%)	272	81,7	4,95	JA
GEN	525,8 (+2,25%)	252	103,4	6,51	NEIN
EQ	534,8 (+4,00%)	282	129,1	7,69	JA

Tab. A-6 Mittelwerte (μm) der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich für die verschiedenen Testgruppen nach 2-, 3- und 9 wöchiger Applikation, sowie Stichprobenumfang (n), Standardabweichung (STDAB), Standardfehler (STF) und Signifikanz bezüglich der Referenzgruppe, $p \leq 0,05$, Varianzanalyse mittels ANOVA und Holm-Sidak.

Kortikalisdicke im metaphysären Bereich					
Gruppe	Mittelwert (μm)	n	STDAB	STF	Signifikanz
2-wöchige Substanzapplikation					
SF	466,8	362	100,5	5,28	-
DHT	474,4	252	108,5	6,83	NEIN
E2	531,8	282	145,3	8,65	JA
GEN	424,5	282	115,1	6,86	JA
EQ	434,7	306	84,5	4,83	JA
3-wöchige Substanzapplikation					
SF	525,5	262	134,2	8,29	-
DHT	437,3	312	106,9	6,05	JA
E2	450,6	450	87,8	4,14	JA
GEN	455,6	581	109,0	4,52	JA
EQ	480,1	365	166,2	8,70	JA
9-wöchige Substanzapplikation					
SF	441,7 (100%)	772	103,1	3,71	-
DHT	434,1 (-1,72%)	842	117,3	4,04	NEIN
E2	438,3 (-0,77%)	780	115,1	4,12	NEIN
GEN	486,3 (+10,1%)	701	133,8	5,05	JA
EQ	472,5 (+6,97%)	762	127,3	4,61	JA

Tab. A-7 prozentuale Trabekelfläche (%Tbfläche) bezogen auf die Bildfläche einer 10fachen Vergrößerung (1,42mm²), die Trabekelfläche pro 100g Körpergewicht (%Tbfläche/100g KG) sowie die Trabekelanzahl (TbN) pro Bildfläche (1,42mm²) für die SF-,DHT-,E2-, GEN- und EQ-Gruppe nach 2-,3- und 9-wöchiger Substanzapplikation.

Prozentuale Trabekelfläche und Trabekelanzahl			
Gruppe	% Tbfläche	% Tbfläche pro 100g KG	TbN
2-wöchige Substanzapplikation			
SF	17,05	4,28	60,61
DHT	15,31	3,89	36,45
E2	16,97	4,6	32,77
GEN	16,61	4,09	38,44
EQ	14,30	3,56	44,82
3-wöchige Substanzapplikation			
SF	16,83	4,05	37,2
DHT	16,71	4,06	31,94
E2	19,74	5,42	36,43
GEN	20,00	4,53	47,36
EQ	21,64	5,15	45,72
9-wöchige Substanzapplikation			
SF	20,11 (100%)	4,62(100%)	34,78 (100%)
DHT	22,72 (+12,9 %)	5,13(+11,0%)	34,5 (-0,8%)
E2	20,99 (+4,4 %)	5,67 (+22,7%)	33,36 (-4,0%)
GEN	13,69 (-31,9 %)	3,19 (-30,9%)	26,14 (-24,8%)
EQ	17,89 (-11,0%)	4,1 (-11,3%)	28,69 (-17,5%)

Tab. A-8 mediane Trabekelgröße: Stichprobenumfang (n), 25%- u. 75%-Perzentilen (25%Pz, 75%Pz) sowie die Signifikanz, $p \leq 0,05$ getestet gegen die SF-Referenzgruppe der entsprechenden Obduktionsgruppe, Auswertung mittels ANOVA und Methode nach Dunn.

mediane Trabekelgröße					
Gruppe	Median	n	25% Pz	75% Pz	Signifikanz
2-wöchige Substanzapplikation					
SF	204,5	1091	80,3	1601,7	-
DHT	554,7	401	136,4	4279,7	JA
E2	643,7	426	109,6	6084,9	JA
GEN	570,9	615	123,4	4755,6	JA
EQ	392,7	493	100,9	2883,4	JA
3-wöchige Substanzapplikation					
SF	421,4	558	104,9	3226,0	-
DHT	630,0	575	130,2	4419,9	NEIN
E2	503,3	1020	103,7	4802,5	NEIN
GEN	303,2	1326	93,8	2807,9	NEIN
EQ	196,4	823	79,5	2421,6	JA
9-wöchige Substanzapplikation					
SF	247,3	1426	86,8	2524,1	-
DHT	210,9 (-14,7%)	1173	84,1	2116,2	NEIN
E2	466,9 (+88,8%)	1101	119,3	3391,4	JA
GEN	412,3 (+66,7%)	915	92,7	4307,9	JA
EQ	261,5 (+5,7%)	1033	83,7	4596,3	NEIN

Tab. A-9 Feretdurchmesser: Median, Stichprobenumfang (n), 25% und 75% Perzentilen (25%Pz, 75%Pz) sowie Signifikanz für die SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe nach 2-,3- und 9-wöchiger Substanzapplikation, $p \leq 0,05$ getestet gegen die jeweilige SF-Referenzgruppe, Auswertung mittels Methode nach Dunn, ANOVA.

Feretdurchmesser					
Gruppe	Median	n	25% Pz	75% Pz	Signifikanz
2-wöchige Substanzapplikation					
SF	16,14	1091	10,11	45,16	-
DHT	26,58	401	13,18	73,82	JA
E2	28,63	426	11,81	88,02	JA
GEN	26,96	615	12,53	77,81	JA
EQ	22,36	493	11,34	60,59	JA
3-wöchige Substanzapplikation					
SF	23,16	558	11,56	64,09	-
DHT	28,32	575	12,87	75,02	NEIN
E2	25,31	1020	11,49	78,20	NEIN
GEN	19,65	1326	10,93	59,79	NEIN
EQ	15,81	823	10,06	55,53	JA
9-wöchige Substanzapplikation					
SF	17,75 (100%)	1426	10,51	56,69	-
DHT	16,39 (-7,6%)	1173	10,35	51,91	NEIN
E2	24,38 (+37,3%)	1101	12,33	65,71	JA
GEN	22,91 (+29,1%)	915	10,86	74,06	JA
EQ	18,25 (+2,8%)	1033	10,32	76,5	NEIN

Tab. A-10 Kompaktheit: Median, Stichprobenumfang (n), 25%- und 75%- Perzentilen (25%Pz, 75%Pz) sowie die Signifikanz für die SF-, DHT-, E2-, GEN- und EQ-Gruppe nach 2-,3- und 9-wöchiger Substanzapplikation, $p \leq 0,05$ getestet gegen die jeweilige SF-Referenzgruppe, Auswertung mittels Methode nach Dunn, ANOVA.

Kompaktheit					
Gruppe	Median	n	25% Pz	75% Pz	Signifikanz
2-wöchige Substanzapplikation					
SF	112,37	1091	57,51	219,77	-
DHT	71,58	401	38,01	138,01	JA
E2	76,45	426	40,68	167,12	JA
GEN	69,56	615	38,62	135,67	JA
EQ	60,42	493	33,93	130,37	JA
3-wöchige Substanzapplikation					
SF	71,06	558	42,54	153,38	-
DHT	72,83	575	40,02	147,20	NEIN
E2	74,20	1020	39,62	159,68	NEIN
GEN	76,86	1326	40,39	157,87	NEIN
EQ	99,49	823	51,31	201,66	JA
9-wöchige Substanzapplikation					
SF	65,66 (100%)	1426	37,46	139,20	-
DHT	69,54 (+5,9%)	1173	39,47	134,53	NEIN
E2	55,20 (-15,9%)	1101	33,12	112,35	JA
GEN	83,74 (+27,5%)	915	43,27	172,41	JA
EQ	89,74 (+36,7%)	1033	46,57	176,43	JA

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Mittlere Futter- und Substanzaufnahme pro 100g Körpergewicht (KG) pro Tag (d) für die entsprechenden Gruppen.....	27
Tab. 2 Zusammenfassung der Wirkung von DHT, E2, GEN und EQ auf die Spongiosa.....	33
Tab. 3 Zusammenfassung der Wirkungen von DHT auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Versuchsergebnissen abgeleitet werden können.....	39
Tab. 4 Zusammenfassung der Wirkungen von E2 auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Studienergebnissen abgeleitet werden können.....	40
Tab. 5 Zusammenfassung der Wirkungen von GEN auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Versuchsergebnissen abgeleitet werden können.....	42
Tab. 6 Zusammenfassung der Wirkungen von EQ auf den osteoporotischen Knochen, die aus unseren Versuchsergebnissen abgeleitet werden können.....	44
Tab. A-1 Übersicht zur Herstellung von Hartschnittpräparaten.....	48
Tab. A-2 Übersicht zur Anfertigung der Goldner-Färbung.....	48
Tab. A-3 Übersicht über die verwendeten Lösungen zur Goldner-Färbung.....	49
Tab. A-4 Körpergewicht der Rattentiere vor der Orchiektomie (Prä-Orx), sowie nach 2-, 3- und 9-wöchiger Substanzapplikation.....	49
Tab. A-5 Daten der Kortikalisdicke im diaphysären Bereich.....	50
Tab. A-6 Daten der Kortikalisdicke im metaphysären Bereich.....	50
Tab. A-7 Daten der prozentualen Trabekelfläche, %Tbfläche bezogen auf das Körpergewicht sowie der Trabekelanzahl.....	51
Tab. A-8 Daten der medianen Trabekelgröße.....	51
Tab. A-9 Daten des Feretdurchmessers.....	52
Tab. A-10 Daten der Kompaktheit.....	52

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Längsschnitt durch den Femurkopf mit Darstellung der Kompakta und Spongiosa.....	2
Abb. 2 Schematische Darstellung des Knochenaufbaus.....	3
Abb. 3 Metabolisierung von Testosteron in Dihydrotestosteron.....	11
Abb. 4 Struktur von 17 β -Östradiol.....	12
Abb. 5 Struktur von Genistein.....	16

Abb. 6 Struktur von Equol.....	17
Abb. 7 Zeitlicher Versuchsaufbau.....	20
Abb. 8. Futterpellets.....	21
Abb. 9 Kunststoffblöcke mit dem Kniegelenk der S.D. Ratte.....	22
Abb. 10 Feinschnitt der Tibia/Femurs der S.D.-Ratte aufgezogen auf einem Objektträger, rechts: Färbung des Längsschnitts nach Goldner.....	22
Abb. 11 Rattentibia, Längsschnitt, 1,25x Vergrößerung.....	23
Abb. 11a Rattentibia, Spongiosa, 10x Vergrößerung.....	23
Abb. 11b Rattentibia, Spongiosa, 10x Vergrößerung.....	23
Abb. 12 Abbildung aus der Sigma Scan Pro Software, Darstellung der Farblayertechnik.....	24
Abb. 13 Unterschiedliche Trabekelformen mit Erläuterung der Kompaktheit.....	25
Abb. 14 Effekte von DHT, E2, GEN und EQ auf das Körpergewicht.....	27
Abb. 15 Wirkung von DHT, E2, GEN und EQ auf die diaphysäre Kortikalisdicke.....	28
Abb. 16 Wirkung von DHT, E2, GEN und EQ auf die metaphysäre Kortikalisdicke.....	29
Abb. 17 Wirkung von DHT, E2, GEN und EQ auf die prozentuale Trabekelfläche und auf die Trabekelanzahl pro Bildfläche (1,42mm ²).....	30
Abb. 18 Wirkung von DHT, E2, GEN und EQ auf die prozentuale Trabekelfläche pro 100g Körpergewicht (KG).....	31
Abb. 19 Wirkung von DHT, E2, GEN und EQ auf die mediane Trabekelgröße, den Feretdurchmesser und die Kompaktheit.....	32
Abb. 20 Gewichtszunahme der S.D.-Ratten mit zunehmenden Alter laut eines Herstellers.....	34

8. Literaturverzeichnis

- Bitto** A, Burnett BR, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA, Minutoli L, Stefano V Di, Irrera N, Antoci S, Granese R, Squadrito Altavilla D (2008): "Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol." *Br J Pharmacol* 155(6):896-905.
- Blake** GM, Fogelman I (2007): "The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis." *Postgrad Med J* 83(982):509-517.
- Cummings** SR, Cawthon RM, Ensrud KE, Cauley JA, Fink HA, Orwoll ES, Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Groups, Study of Osteoporotic Fractures Research Groups (2006): "BMD and risk of hip and nonvertebral fractures in older men: a prospective study and comparison with older women." *J Bone Miner Res* 21(10):1550-1556.
- Doran** PM, Riggs BL, Atkinson EJ, Khosla S (2001): "Effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on bone turnover markers and serum sex steroid and lipid levels in elderly men." *J Bone Miner Res* 16(11):2118-2125.
- Duan** Y, Turner CH, Kim BT, Seeman E (2001): "Sexual dimorphism in vertebral fragility is more the result of gender differences in age-related bone gain than bone loss." *J Bone Miner Res* 16(12):2267-2275.
- Ducy** P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): "Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation." *Cell* 89(5):747-754.
- Dachverband Osteologie (DVO)-Leitlinien** (2009): www.dv-osteologie.org, 2009.
- Falahati-Nini** A, Piggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S (2000): "Relative contributions of testosterone and estrogen in regulation bone resorption and formation in normal elderly men." *J Clin Invest* 106(12):1553-1560.
- Fanti** P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH (1998): "The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-Term ovariectomized Rats." *Osteoporos Int* 8(3):274-281.
- Feldstein** AC, Nichols G, Orwoll E, Elmer PJ, Smith DH, Herson M, Aikin M (2005): "The near absence of osteoporosis treatment in older men with fractures." *Osteoporos Int* 16(8):953-962.
- Filipovic** B, Susic-Jurjevic B, Ajdzanovic V, Brkic D, Manojlovic-Stojanoski M, Milosevic V, Sekulic M (2009): "Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats." *Osteoporos Int* 21(9):1609-1616.
- Fonseca** D, Ward WE (2004): "Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice." *Bone* 35(2):489.
- Forsen** L, Sogaard AJ, Meyer HE, Edna T, Kopjar B (1999): "Survival after hip fracture: short- and long term excess mortality according to age and gender." *Osteoporos Int* 10(1):73-78.

- Frenkel** B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y (2010): "Regulation of Adult Bone Turnover by Sex Steroids." *J Cell Physiol.* 224(2):305-310.
- Frost** HM Jee WSS (1992): "On the rat model of human osteopenia and osteoporosis." *Bone Miner* 18(3):227-236.
- Gentry** RT, Wade GN (1976): "Androgenic control of food intake and body weight in male rats." *J Comp Physiol Psychol* 90(1):18-25.
- Geoffroy** V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P (2002): "High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa 1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage." *Mol Cell Biol* 22(17):6222-6233.
- Ha** H, Lee HY, Lee JH, Jung D, Choi J, Song KY, Jung HJ, Choi JS, Chang SI, Kim C (2010): "Formononetin prevents ovariectomy-induced bone loss in rats." *Arch Pharm Res* 33(4):625-632.
- Hammond** GL (2002): "Access of reproductive steroids to target tissues." *Obstet Gynecol Clin North Am* 29(3):411-423.
- Häussler** B, Gothe H, Mangiapane S, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2006): "Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland" *Dtsch Arztebl* 103(39):2542-2548.
- Häussler** B, Gothe H, Gol D (2007): "Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany. The BoneEVA Study." *Osteoporos Int* 18(1):77-84.
- Herold** G, Alani S, Beckers H, Braun PR, Deuss U, Drexler H, Faber L, Gwaz M, Germing U, Hagenström H, Harten P, Heintges T, Höning W, Janssen A, Kaemmerer H, Kindler J, Krebs P, Mellwig KP, Mellinghoff A, Mödder G, Moll S, Oette M, Sauer W, Schmidt KH, Weber AA: "Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung." Gerd Herold und Mitarbeiter, Köln 2005, S. 655-658.
- Hertrampf** T, Degen G, Kaid AA, Laudenbach-Leschowsky U, Seibel J, Di Vigilio AL Diel P (2006): "Combined Effects of Physical Activity, Dietary Isoflavones and 17β-Estradiol on Movement Drive, Body Weight and Bone Mineral Density in Ovariectomized Female Rats." *Planta Med* 72(6):484-487.
- Hou** NN, Zhu YM, Huang HF (2006): "The expression of estrogen receptor alpha and beta in the intervention of different estrogens in rat bone metabolism." *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 39(4):289-296.
- Ishimi** Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K, Miyaura C (2002): "Genistein, a Soyabean Isoflavone, Affects Bone Marrow Lymphopoiesis and Prevents Bone Loss in Castrated Male Mice." *Bone* 31(1):180-185.
- Johnell** O, Kanis JA (2006): "An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures." *Osteoporos Int* 17(12):1726-1733.
- Kalu** DN (1991): "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss." *Bone Miner* 15(3):175-191.
- Kanis** A, Johansson H, Oden A, McCloskey E (2010): "A meta-analysis of the efficacy of raloxifene on all clinical and vertebral fractures and its dependency on FRAX." *Bone* doi:10.1016/j.bone.2010.06.009.

- Khosla** S, Riggs BL (2003): "Androgens, estrogens, and bone turnover in men." *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2352-2353.
- Khosla** S, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM (2001): "Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men." *J Clin Endocrinol Metab* 86(8):3555-3561.
- Khosla** S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, Peterson JM, Melton III LJ (2006): "Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based non-invasive in vivo assessment." *J Bone Miner Res* 21(1):124-131.
- King** RA, Broadbent JL, Head RJ (1996): "Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats." *J Nutr* 126(1):176-182.
- Kishida** T, Mizushige T, Ohtsu Y, Ishikawa S, Nagamoto M, Izumi T, Obata A, Ebihara K (2008): "Dietary soy isoflavone-aglycone lowers food intake in female rats with and without ovariectomy." *Obesity* 16(2):290-297.
- Kostelac** D, Rechkemmer G, Briviba K (2003): "Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element." *J Agric Food Chem* 51(26): 7632-7635.
- Krum** SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, Brown M (2008): "Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival." *EMBO J* 27(3):535-545.
- Kumar** N, Crozat A, Li F, Catterall JF, Bardin CW, Sundaram K (1999): "7alpha-methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen with high potency: structure-activity comparisons with other androgens." *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:213-222.
- Kwak** HS, Park SY, Kim MG, Yim CH, Yoon HK, Han KO (2009): "Marked Individual Variation in Isoflavone Metabolism After a Soy Challenge can Modulate the Skeletal Effect of Isoflavones in Premenopausal Woman." *J Korean Med Sci* 24(5):867-873.
- Leder** BZ, LeBlanc KM, Schoenfeld DA, Eastell R, Finkelstein JS (2003): "Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men." *J Clin Endocrinol Metab* 88(1):204-210.
- Lüllmann** H, Mohr K, Hein L: "Pharmakologie und Toxikologie." 16. Auflage, George Thieme Verlag, Stuttgart 2006, S.262.
- Lüllmann-Rauch** R: "Histologie." George Thieme Verlag, Stuttgart 2003, S.122-134.
- Marini** H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M (2007): "Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial." *Ann Intern Med* 146(12): 839-847.
- Mathey** J, Mardon J, Fokialakis N, Puel C, Kati-Coulibaly S, Mitakou S, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Davicco J, Lebecque P, Horcajada MN, Coxam V (2004): "Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case of equol." *Osteoporos Int* 18(5):671-679.

- Melton** LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL (1992): "How many women have osteoporosis." *J Bone Miner Res* 7(9):1005-1010.
- Morito** K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y (2001): "Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta." *Biol Pharm Bull* 24(4):351-356.
- Morton** MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA (2002): "Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age." *J Nutr* 132(10):3168-3171.
- Movérare** S, Venken K, Eriksson AL, Andersson N, Skrtic S, Wergedal J, Mohan S, Salmon P, Bouillon R, Gustafsson JA, Vanderschueren D, Ohlsson C (2003): "Differential effects on bone of estrogen receptor alpha and androgen receptor activation in orchidectomized adult male mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23):13573-13578.
- Nakamura** T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S (2007): "Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts." *Cell* 130(5):811-823.
- NIH - Natinal Institute of Health** Consensus Development Panel (2001): "Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy." *JAMA* 285(6):785-795.
- Ohlson** C, Vanderput L (2009): "The role of estrogens for male bone health." *Eur Endocrinol* 160:883-889.
- Orwoll** E, Ettinger M, Weiss S, Miller P, Kendler D, Graham J, Adami S, Weber K, Lorenc R, Pietschmann P, Vandormael K, Lombardi A (2000): "Alendronate for the treatment of osteoporosis in men." *N Engl J Med* 343(9):604-610.
- Orwoll** E, Lambert LC, Marshall LM, Phipps K, Blank J, Barrett-Connor E, Cauley J, Ensrud K, Cummings S (2006): "Testosterone and estradiol among older men." *J Clin Endocrinol Metab* 91(4):1336-1344.
- Oseni** T, Patel R, Pyle J, Craig J (2008): "Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens." *Planta Med* 74(13): 1656-1665.
- Picherit** C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP (2000): "Daidzein is more Efficient than Genistein in Preventing Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats." *J Nutr* 130(7):1675-1681.
- Pitschmann** P, Kudlacek S, Peterlik M (2004): "Pathogenese und Therapie der Osteoporose beim Mann." *J Mineralstoffwechsel* 11(2): 12-14.
- Rachon** D, Seidlova-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W (2007): "Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats." *Maturitas* 58(3):308.
- Rickard** DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC (2003): "Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta." *J Cell Biochem* 89(3): 633-646.

- Riggs** BL, Melton III LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Peterson JM, Rouleau RA, McCollough CH, Bouxsein ML, Khosla S (2004): "Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites." *J Bone Miner Res* 19(12):1945-1954.
- Rohr** DU, Metka M, Nadjafi C, Clementi W (2008): "Wirkung von Isoflavonen beim Menschen – Überblick und Diskussion" *J Gynäkol Endokrinol* 18(3): 22-31.
- Rossouw** JE, Anderson GL, Prentice PR, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002): "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* 288(3):321-333.
- Roudebush** R, Magee DE, Benslay DN, Bendele AM, Bryant HU (1993): "Effect of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat." *Calcif Tissue Int* 53(1):61.
- Sato** Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K (2005): "Risedronat sodium therapy for prevention of hip fracture in men 65 years or older after stroke." *Arch Intern Med* 165(15):1743-1748.
- Schiebler** TH, Schmidt W: "Anatomie." 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2002, S.65-70.
- Schot** L, Schuurs A (1990): "Pathophysiology of bone loss in castrated animals." *J Steroid Biochem Molec Biol* 37(3):461-465.
- Seemann** E (2002): "Pathogenesis of bone fragility in women and men." *Lancet* 359(9320):1841-1850.
- Sehmisch** S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): "Effect of Isoflavones Equol and Genistein on bone quality in a rat osteopenia model." *Phytother Res* 24(2):168-174.
- Setchell** KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E (2002): "The clinical importance of the metabolite Equol – A clue to the effectiveness of Soy and its isoflavones." *J Nutr* 132(12):3577-3584.
- Sfakianos** J, Coward L, Kirk M, Barnes S (1997): "Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats." *J Nutr* 127(7):1260-1268.
- Silva** MJ, Gibson LJ (1997): "Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age related changes in microstructure." *Bone* 21(2):191-199.
- Simpson** ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hishelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD (1994): "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis." *Endocr Rev* 15(3):342-355.
- Singer** BR, McLauchlan GJ, Robinson CM, Christie J (1998): "Epidemiology of fractures in 15.000 adults: the influence of age and gender." *J Bone Joint Surg Br* 80(2):243-248.

- Statistisches Bundesamt**, Gesundheitsbereichsbericht des Bundes (2006):
http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=21415133&nummer=553&p_sprache=D&p_indsp=445&p_aid=46812800.
- Stürmer** EK, Sehmisch S, Tezval M, Tezval H, Rack T, Boekhoff J, Wuttke W, Herrmann TR, Seidlova-Wuttke D, Stürmer KM (2009): "Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats." *World J Urol* 27(4):547-555.
- Tuukkanen** J, Peng Z, Väänänen HK (1994): "Effect of running exercise on the bone loss induced by orchidectomy in the rat." *Calcif Tissue Int* 55(1):33-37.
- Vandenput** L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D (2002): "Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17 β -Estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5 α Dihydrotestosterone." *J Bone Miner Res* 17(11): 2080-2086.
- Vanderschueren** D, Van Herck E, Suiker AM, Visser WJ, Schot LP, Bouillon R (1992): "Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency." *Endocrinology* 130(5):2906-2916.
- van Staa** TP, Dennison EM, Leufkens HG, Cooper C (2001): "Epidemiology of fractures in England and Wales." *Bone* 29(6):517-522.
- Venken** K, De Gendt K, Boonen S, Ophoff J, Bouillon R, Swinnen JV, Verhoeven G, Vanderschueren D (2006): "Relative impact of androgen and estrogen receptor activation in the effects of androgens on trabecular and cortical bone in growing male mice: a study in the androgen receptor knockout mouse model." *J Bone Miner Res* 21(4):576-585.
- Vidal** O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C (2000): "Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10):5474-5479.
- Wade** G (1972): "Gonadal Hormones and Behavioral Regulation of Body Weight." *Physiol Behav* 8(3):523-534.
- Wakley** G, Schutte HD, Hannon KS, Turner RT (1991): "Androgen Treatment prevents Loss of of Cancellous Bone in orchietomized Rats." *J Bone Miner Res* 6(4):325-330.
- Wang** C, Swerdloff RS (2002): "Should the nonaromatizable androgen dihydrotestosterone be considered as an alternative to testosterone in the treatment of the andropause?" *J Clin Endocrinol Metab* 87(4):1462-1466.
- WHO** (1994): "Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group." *World Health Organ Tech Rep* 843:1-129.
- Wronski** T, Lowry P, Walsh C, Ignaszewski L (1985): "Skeletal alterations in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 37(3):324.

www.biofachforum.ch/BIOPIC/humloes/musk2.JPG, Pädagogische Hochschule des Kantons Sankt Gallen, 2010.

www.schweineban.de/index.htm, Iris Rezk Salama, 2010.

www.taconic.com wmspage.cfm?parm1=653Tabellenverzeichnis, Taconic Inc., 2010.

www.visualhistology.com/products/atlas/VisualHistology_Atlas_2-0-71_1.jpg, Dave Moran, 2010.

Xu M, Wang HJ, Murphy PA, Cook L, Hendrich S (1994):"Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women." J Nutr 124(6): 825–832.

Xu M, Qi C, Deng B, Deng PX, Mo CM (2009):"Phytotherapy versus hormonal therapy for postmenopausal bone loss: a meta-analysis." Osteoporos Int 20(4):519-526.

Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H (2001):"Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis." Endocrinology 142(8):3632-3637.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Dr. K.G. Wiese für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit sowie für die Möglichkeit des wissenschaftlichen, experimentellen Arbeitens und für die fürsorgliche Betreuung und den fachlichen Austausch bedanken. Meine besondere Anerkennung gilt seiner ständigen Gesprächsbereitschaft und seinen vielfältigen, anregenden Anmerkungen. Insbesondere bei der Aufarbeitung der Ergebnisse sowie bei der Erstellung des schriftlichen Teils dieser Dissertation bin ich ihm für seine Unterstützung verbunden. Mein Dank gilt auch Dr. D. Seidlowa-Wuttke, die insbesondere die Betreuung des Tierexperiments sehr unterstützt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei dem Forschungsteam der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie für die weitreichende Hilfe in der Aufarbeitung der Präparate bedanken. Mein besonderer Dank gilt hier A. Ahrbecker, die ebenfalls allzeit ansprechbar war.

Lebenslauf

Am 21. Oktober 1982 wurde ich als erstes Kind meiner Eltern, Angela und Eckhard Bohnsack, in der Kleinstadt Kyritz im jetzigen Land Brandenburg geboren. Ich wuchs in einer harmonischen und liebevollen Familie auf, die mich stets förderte und unterstützte. Im Alter von 12 Jahren besuchte ich das Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium in meiner Heimatstadt und legte im Jahre 2002 ein erfolgreiches Abitur ab. Nach der Absolvierung der Hochschulreife entschied ich mich, als Aupair und Student in die Vereinigten Staaten von Amerika zu gehen und verbrachte dort 18 Monate, in denen ich viele, mir in meinem späteren Leben sehr nützliche Erfahrungen sammeln konnte. Ich bereiste und entdeckte die USA.

Nach meiner Rückkehr entschloss ich mich zum Studium der Medizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Auch in dieser Zeit nutzte ich Famulaturen und Praktika nicht nur um medizinische Erfahrungen zu sammeln, sondern ebenso um die Regionen Deutschlands kennenzulernen. Ich absolvierte praktische Anteile des Studiums u.a. in Neunkirchen (Lehrkrankenhaus der Universität Homburg/Saarland), Hamburg (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf), Neuruppin (Lehrkrankenhaus der Charité in Berlin) und in Göttingen bzw. seinen Lehrkrankenhäusern. Auch während meines Studiums besuchte ich die USA und hospitierte vor Ort, um Einblicke in das dortige Gesundheitssystem zu bekommen. In meinem praktischen Jahr entschied ich mich für einen Auslandsaufenthalt auf den Seychellen, um das medizinische Versorgungssystem in Afrika kennenzulernen. Diese Erfahrung hat mir sehr geholfen, die Unterschiede der Gesundheitsversorgung der westlichen Länder und der Entwicklungsländer besser zu verstehen.

Aufgrund meiner Freude an der klinischen Untersuchung bzw. klinisch-praktisch-orientierten Diagnostik entschied ich mich für das Wahlfach Neurologie, denn in diesem Teilbereich der Medizin kommt meiner Meinung nach der klinischen Untersuchung und der Arbeit mit dem Patienten ein besonders hoher Stellenwert zu. Nach dem erfolgreichen Abschluss des Medizinstudiums im Juni 2010 entschied ich mich zur Fertigstellung meiner Dissertation, bevor ich als Assistenzärztin eine Stelle in der Inneren Medizin antreten möchte.